

**Aus dem Städt. Klinikum München – Harlaching GmbH**

Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, klinische Immunologie

Akademisches Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. J.E. Scherberich

Vorgelegt über

Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Expression monozytärer Ziel- und Effektorantigene unter Einfluss  
verschiedener Pharmaka und Lipoproteine**

**In vitro Analysen zu den Funktionsmarkern CD14 (Endotoxinrezeptor),  
CD16 (Fc-gamma III Rezeptor), HLA-DR und Toll-like Rezeptor 2 und 4 (TLR2, TLR4)**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Maria Anna Sehner, geb. Kellermeyer

aus Rosenheim

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Referent:	Univ.-Prof. Dr. Kaspers
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Gabius

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

## **Meiner Familie**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>15</b>
2.1	Erkennung von Erregern oder deren Bestandteilen durch Komponenten des Immunsystems .....	15
2.2	Toll-like Rezeptoren .....	15
2.2.1	Die Bedeutung von TLRs in der Immunabwehr .....	15
2.2.2	Drosophila Toll und phylogenetische Aspekte .....	18
2.2.3	TLRs und ihre Liganden .....	19
2.3	Endotoxinrezeptor, CD14 .....	23
2.4	Fc- $\gamma$ -III Rezeptor, CD16 .....	23
2.5	HLA-DR .....	23
2.6	Monozyten .....	23
2.6.1	Morphologische Eigenschaften von Monozyten .....	23
2.6.2	Aufgaben der Monozyten im Rahmen der Infektionsabwehr .....	24
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.1	Material .....	26
3.2	Methoden .....	28
3.2.1	Isolierung peripherer Blutmonozyten .....	28
3.2.2	Zellkultur .....	28
3.2.3	Untersuchte Substanzen .....	29
3.2.4	Aufbereitung und Markierung der Monozyten aus der Zellkultur .....	29
3.2.5	Durchflusszytometrie (FACS) .....	30
3.2.6	Zellsortierung im FACS nach Zellgröße und Granularität .....	32



3.2.7	Differenzierung im FACS nach definierten Oberflächenantigenen .....	32
3.2.8	Statistische Methoden.....	33
<b>4</b>	<b>Eigene Untersuchungen.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeine Analysen ohne Pharmaka.....</b>	<b>34</b>
4.1.1	Spontanverlauf der Rezeptorexpression über die Kulturzeit.....	34
4.1.1.1	CD14 und CD16 .....	34
4.1.1.2	HLA-DR .....	36
4.1.1.3	TLR2 und TLR4 .....	37
4.1.2	CD14++, CD14+ CD16+ und CD16++ im Vergleich.....	37
4.1.3	TLR2 und TLR4 auf den Subpopulationen .....	38
<b>4.2</b>	<b>Pharmaka.....</b>	<b>40</b>
4.2.1	Erythropoietin (EPO): Epoetin alpha und NESP .....	40
4.2.1.1	Einfluss von EPO auf Monozytenantigene (in vitro) .....	40
4.2.1.2	Einfluss von NESP auf Monozytenantigene (in vitro) .....	45
4.2.2	Bisphosphonate: Ibandronsäure .....	47
4.2.3	Glucocorticoide: Prednisolon .....	50
4.2.4	Atorvastatin, LDL und e-LDL.....	58
4.2.4.1	Einfluss von Atorvastatin auf Monozytenantigene (in vitro) .....	58
4.2.4.2	Einfluss von LDL und e-LDL auf Monozytenantigene (in vitro).....	61
4.2.4.3	Transmissionselektronenmikroskopie .....	66
4.2.4.4	Einfluss von Atorvastatin mit LDL und e-LDL auf Monozytenantigene (in vitro) .....	70
4.2.5	Vitamin D - Derivate: 1-alpha-Calcidol und Calcitriol.....	71
4.2.6	Xanthinderivate: Pentoxifyllin .....	80
<b>4.3</b>	<b>Spenderspezifische Aspekte.....</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>86</b>

5.1	Allgemeine Analysen .....	88
5.2	Erythropoietin.....	89
5.3	Bisphosphonate .....	92
5.4	Glukokortikoide:.....	93
5.5	LDL und e-LDL .....	96
5.6	Atorvastatin .....	98
5.7	Vitamin D .....	100
5.8	Xanthinderivate .....	101
6	Zusammenfassung .....	104
7	Summary .....	108
8	Literaturverzeichnis.....	112
9	Danksagung .....	125

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgemeinschaft
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation (System zur Bezeichnung von Differenzierungsantigenen)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CpG	Deoxycytidylphosphat-Deoxyguanylat
DNA	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDA	Extra Domain A
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
e-LDL	enzymatisch modifiziertes Low Density Lipoprotein
EPO	Erythropoietin
FACScan®	Fluorescence Activated Cell Scanner (Fluoreszenzaktiviertes Zellmessgerät)
Fc	Fragment Cristalline (Kristallisierbarer Antikörperteil, carboxy-terminales Fragment von Immunglobulinen nach Papain-Spaltung)
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan®
g	Gravitationsbeschleunigung
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	hora (lateinisch: Stunde)
HLA-DR	Human Leucocyte Antigen – System
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HSP	Heat Shock Protein (Hitzeschockprotein)
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton (Molekulargewicht)
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
l	Liter
LAM	Lipoarabinomannan
LBP	Lipopolysaccharid-Binding Protein

LDL	Low Density Lipoprotein
LRR	Leucin Rich Repeat – Domäne
LPS	Lipopolysaccharid
Ltd.	limited, (Private Company)
$\mu$	mikro ( $\times 10^{-6}$ )
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
m	milli ( $\times 10^{-3}$ )
$\mu\text{m}$	Mikrometer
M	Molar (M/l)
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1
MD	Protein, durch Lymphocyte antigen 96 produziert
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MyD88	Myeloid Differentiation Factor-88
n	nano ( $\times 10^{-9}$ )
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa\text{B}$	Nuclear factor-kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Nitric Oxid (Stickstoffmonoxid)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pH	pondus/ potentia Hydrogenii
PAF	Platelet Activating Factor (Plättchenaktivierender Faktor)
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern (Molekulare Muster von Erregern)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cychrome5
PRR	Pattern Recognition Receptor (Molekulare Muster erkennender Rezeptor)
RFC	Relative Fluorescence Channel
RNA	Ribonucleinacid (Ribonukleinsäure)
rpm	rates per minutes
RPMI	Zellkulturmedium
sCD14	soluble CD14 (lösliches CD14)
SLE	Systematischer Lupus Erythematosus
sog.	sogenannt

SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan®
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TIR	Toll/ Interleukin1 Rezeptor Domäne
TIRAP	TIR domain containing Adaptor Protein (in der TIR-Domäne beinhaltetes Adaptorprotein)
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	TRIF related Adaptor Molecule (TRIF-verwandtes Adaptormolekül)
TRIF	TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$ (die TIR-Domäne beinhaltender, IFN- $\beta$ induzierender Adaptor)
UK	United Kingdom

# 1 Einleitung

Monozyten sind wichtige Bestandteile des Immunsystems. Sie gehören zu den weißen Blutzellen (Leukozyten) und sind mit einem Durchmesser von bis zu 20µm die größten zirkulierenden Zellen im Blut. Gebildet durch Stammzellen des Knochenmarks wandern sie nach ein bis drei Tagen im Blutkreislauf in das Gewebe aus und entwickeln sich dort weiter zu Makrophagen oder dendritischen Zellen. Auf ihrer Oberfläche exprimieren Monozyten verschiedene Antigene. Diese immunphänotypischen Merkmale sind in der Nomenklatur der Cluster of Differentiation (CD-Moleküle) erfasst. Das CD14-Molekül als sogenannter Endotoxinrezeptor erkennt und bindet vor allem bakterielles Lipopolysaccharid (LPS). Der niedrig-affine Fc-γ-III Rezeptor CD16 bindet Immunglobuline und steht eng mit der Phagozytose in Verbindung. Weiterhin exprimieren Monozyten HLA-DR-Moleküle sowie Toll-like Rezeptoren (TLR). HLA-DR spielt bei der monozytären Interaktion mit T-Zellen (Antigenpräsentation) eine große Rolle. Die Gruppe der Toll-like Rezeptoren wurde erst vor wenigen Jahren entdeckt und gehört zu den angeborenen hochkonservierten Erkennungsstrukturen des Immunsystems.

Sind Pathogene im Körper identifiziert, muss das Immunsystem in einer angemessenen Weise reagieren. Über die Antigen-Bindung werden oben genannte Rezeptoren aktiviert und senden Signale an die Zelle. In Folge sezernieren die Monozyten vermehrt entzündungsauslösende Stoffe wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6 oder Tumornekrosefaktor (TNF-α). Diese Mediatoren werden als proinflammatorische Zytokine zusammengefasst. Derartig aktivierte Blutmonozyten des Phänotyps CD14+ und CD16+ sind dabei unmittelbar an der Erkennung und Abwehr mikrobieller Erreger beteiligt. Wird diese Aufgabe nicht ausreichend erfüllt, kommt es zur Infektionserkrankung. Demgegenüber sind auch überschießende Reaktionen des Immunsystems zu beobachten. Unkontrollierte Entzündungen, Sepsis, Allergien und Autoimmunerkrankungen sind die Folge.

Proinflammatorische, d.h. zytokinproduzierende Monozyten sind Ziel- und Effektorzellen bei Systemerkrankungen, Infektionen, Bluthochdruck, Organfibrosen, Tumorerkrankungen und der akzelerierten Atherosklerose. Durch dieses weite Spektrum stellt sich auch die Frage, wie monozytäre Rezeptoren auf verschiedene pharmakologische Substanzen reagieren. In der vorliegenden Arbeit sollen über die bekannten Wirkungen der Pharmaka hinausgehend mögliche immunmodulatorische Effekte geprüft werden. Im Fokus unserer Untersuchungen standen Erythropoietin, Bisphosphonate, Glukokortikoide, Pentoxifyllin, Vitamin D-Derivate und Statine.

Ein Ziel derartiger Untersuchungen war es, durch systematische immun-phänotypische Analysen peripherer Blutmonozyten auch Parameter für das „Monitoring“ eines Patienten unter immunsuppressiver bzw. antiinflammatorischer Therapie zu definieren (Scherberich et al. 2004). Das Promotionsvorhaben sollte hierbei einen Beitrag leisten, indem die mögliche Beeinflussung der Expression funktionell wichtiger Rezeptoren humaner Monozyten in Zellkultur untersucht wurde.

Am Anfang stand die Betrachtung der monozytären Oberflächenantigene CD14, CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4: *Wie ändert sich die Rezeptor-Expression im Verlauf der Kulturzeit?* Ein wichtiger Ligand für CD14 und TLR4 ist das bakterielle Endotoxin: *Welchen Einfluss hat die Stimulierung der Zellen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS)?*

Unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen verschiebt sich die Monozytengesamtpopulation zugunsten eines CD16 positiven Subtyps (Nockher und Scherberich 1994). Zellen mit aktivierten Fc- $\gamma$ -III Rezeptoren (CD16+) leiten vermutlich eine stärkere Entzündungsreaktion ein, adhären stärker ans Endothel, sind potenter in der Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen und haben eine größere Phagozytosekapazität (Nockher et al. 1998). *Relevant ist also die Frage, wie sich der proinflammatorische Subtyp (CD14+ CD16+) unter dem Einfluss bakteriellen Endotoxins und den untersuchten pharmakologischen Substanzen modulieren lässt.*

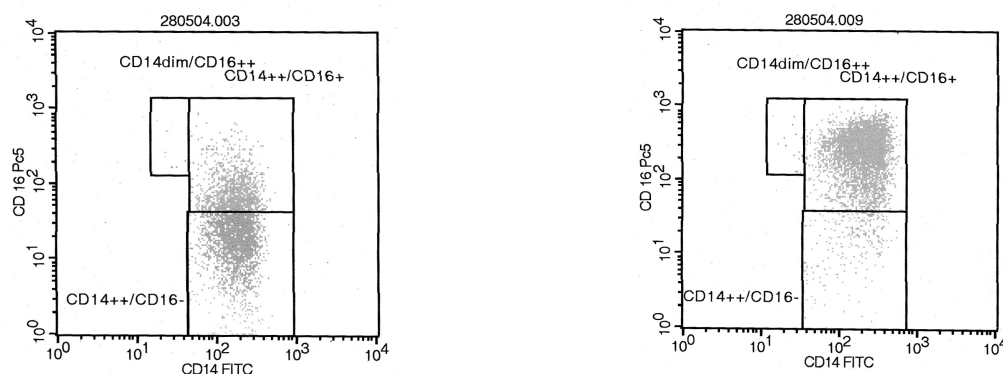


Abbildung 1: Beispiel für eine Verschiebung des CD14++ Rezeptors zugunsten des Fc- $\gamma$ -III Rezeptors CD16 kultivierter humaner Blutmonozyten (rechte Abbildung). Entwicklung des proinflammatorischen CD14 CD16 Zelltyps.

Das Auftreten von Infektionen bei Patienten korreliert mit einer verminderten Expression von HLA-DR auf Monozyten. Dies wird bereits als Verlaufskontrolle von Infektionen und Trauma verwendet (Scherberich, Hanisch 2003). *Wie kann die monozytäre HLA-DR-Expression durch die definierten Pharmaka moduliert werden?*

Die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR) erkennt ein breites Spektrum spezifischer Muster mikrobieller Pathogene. Damit gehören die TLR zu den so genannten „pattern recognition

receptors“ („Überlebensrezeptoren“) (Janeway et al. 2002). Stimulierte Toll-like Rezeptoren aktivieren intrazelluläre Signalfade. Makrophagenaktivierung, Induktion „antimikrobieller“ wirtseigener Gene und inflammatorischer Zytokine mit konsekutiver Überwindung der Infektion sind die Folge (Salomão et al. 2008).

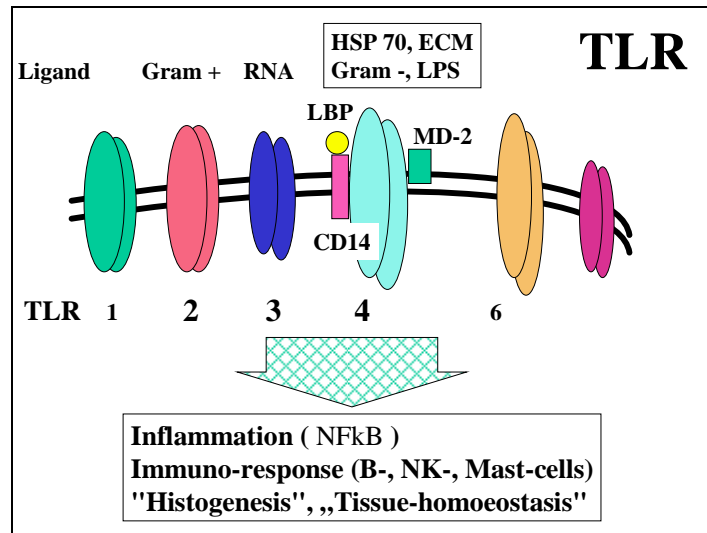


Abbildung 2: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (HSP = Hitzeschockprotein, ECM = Extrazelluläre Matrix)

Aus der tragenden Rolle der Toll-like Rezeptoren ergab sich für uns die Frage: *Wie verändert sich die Expression der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 (TLR2, TLR4) unter den vorliegenden Versuchbedingungen?*

*Erythropoietin* (EPO) stimuliert im Knochenmark die Neubildung roter Blutzellen. Neben dieser Aufgabe weisen Ergebnisse verschiedener Arbeiten auf antiinflammatorische Eigenschaften von EPO hin. So untersuchten Cuzzocrea et al. bei Mäusen den entzündungshemmenden Effekt im Zusammenhang mit Kollagen-induzierter Arthritis. Die Plasma-Konzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  ließ sich durch EPO signifikant vermindern. Zusätzlich verringerte EPO die chondrozytäre Apoptose im Gelenkknorpel (Cuzzocrea et al. 2005). *Bestätigt sich in den vorliegenden Untersuchungen ein antiinflammatorischer Effekt von EPO?*

*Bisphosphonate* werden für diagnostische und therapeutische Zwecke bei verschiedenen Knochen- und Kalziumstoffwechselkrankheiten eingesetzt. Untersuchungen zeigten einen antiproliferativen Effekt auf das Tumorwachstum: Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix und die Entstehung ossärer und wahrscheinlich auch viszeraler Metastasen wird reduziert (Boissier et al. 1997). Damit stellte sich uns die Frage: *Welchen Einfluss haben Bisphosphonate auf antigenpräsentierende Zellen (Monozyten)?*



*Glukokortikoide* vermitteln neben der Stimulation der Glukoneogenese, der Wirkungen auf Hämatopoese, Muskel-, Wasser-, Elektrolyt- und Eiweißstoffwechsel antiinflammatorische Eigenschaften. Aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung sind Glukokortikoide essentiell in der Therapie entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen. Bei akuter Entzündung erhöht sich allerdings die Gefahr sekundärer Infektionen unter einer hochdosierten Gabe von Glukokortikoiden. Neuere Studien belegen dagegen einen positiven Effekt niedrigdosierter Glukokortikoide bei septischem Schock (Keh et al. 2003). Im Hinblick auf diese unterschiedlichen klinischen Wirkungen sollen in der vorliegenden Arbeit die immunmodulatorischen Effekte von Glukokortikoiden auf Monozyten in vitro weiter analysiert werden. Die Vorarbeiten beschränkten sich bisher auf deren modulierende Wirkung auf den pleiotropen LPS-Rezeptors CD14 (Nockher, Scherberich 1997).

*Vitamin D* ist für die Aufnahme von Kalzium aus dem Darm und dessen Einlagerung in die Knochenmatrix wichtig. Die soweit bekannten nicht-kalzämischen („nichttraditionellen“) Wirkungen von Vitamin D erstrecken sich auf verschiedene Zellgruppen: Bei aktivierten Lymphozyten wird z.B. die Proliferation sowie die Synthese von IL-2, Interferon (IFN) und die Antikörpersynthese gehemmt. Bei neoplastischen Zellen im Rahmen der Tumorgenese bewirkt Vitamin D ebenfalls eine Proliferationshemmung (Shoji et al. 2004). Antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten besitzen auch Vitamin D-Rezeptoren sowie eine 1-Alpha-Hydroxylase zur eigenen Synthese von Vitamin D (Wang et al. 2004). *Welche monozytären Reaktionen sind auf Vitamin D-Derivate als potentiell immunmodulatorische Substanzen zu erwarten?*

*Pentoxifyllin* aus der Gruppe der Xanthinderivate wird vor allem zur Behandlung peripherer, aber auch zerebraler Durchblutungsstörungen eingesetzt. Im Tiermodell hemmt Pentoxifyllin die Adhäsivität von Leukozyten am Gefäßendothel, die Leukozytenaktivierung – Hemmung von Produktion und Aktivität proinflammatorischer Zytokine – und somit dadurch bedingte Endothelschäden in vivo und in vitro (Santucci et al. 1995, Chen et al. 2004). In vitro hemmt Pentoxifyllin die monozytäre Produktion von TNF- $\alpha$  und die Produktion von IFN- $\gamma$  in T-Lymphozyten (Tsujino et al. 1997). *Wie werden daher monozytäre Rezeptoren wie CD14, CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4 auf Pentoxifyllin reagieren?*

*Statine* werden zunehmend als „immun-modulatorische“ Substanzen bei verschiedenen Erkrankungen geprüft und eingesetzt. Bislang fanden Statine Verwendung als Cholesterinsenker bei gestörtem Fettstoffwechsel. Als Transportmittel für das Cholesterol im Blut dienen verschiedene Lipoproteine. Erhöhte Plasmakonzentrationen an Low Density Lipoprotein (LDL) erhöhen die Gefahr einer Atherosklerose und das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen. Nach einer Arbeitshypothese von Bhakdi der Universität Mainz entsteht enzymatisch

verändertes LDL (e-LDL) durch Einwirkung zelleigener lysosomaler Enzyme nach Freisetzung des Cholesterols in der Zelle und ist in atherosklerotischen Veränderungen zu finden. Nicht oxidiertes LDL sondern enzymatisch verändertes LDL soll die entscheidende pathophysiologische Rolle in der Genese der Atheromatose spielen (Bhakdi 2003).

Blutmonozyten bzw. Makrophagen sind aktiv an der lokalen Erkennung und Eliminierung von Lipoproteinen beteiligt. Durch starke intrazelluläre Akkumulation von Lipoproteinen mit Transformation der Zellen in „Schaumzellen“ kommen inflammatorische Prozesse in Gang (Zytokinbildung). Eine lipidsenkende Statin-Therapie nähme Einfluss auf die Aktivierung des zellulären Immunsystems und reduzierte möglicherweise reaktive, Lipid-vermittelte inflammatorische Antworten. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, inwieweit Statine allein oder in Kombination mit LDL und e-LDL monozytäre Oberflächenantigene modulieren können und welche Effekte auf die Immunzellen nach Inkubation mit LDL und e-LDL in vitro zu beobachten sind.

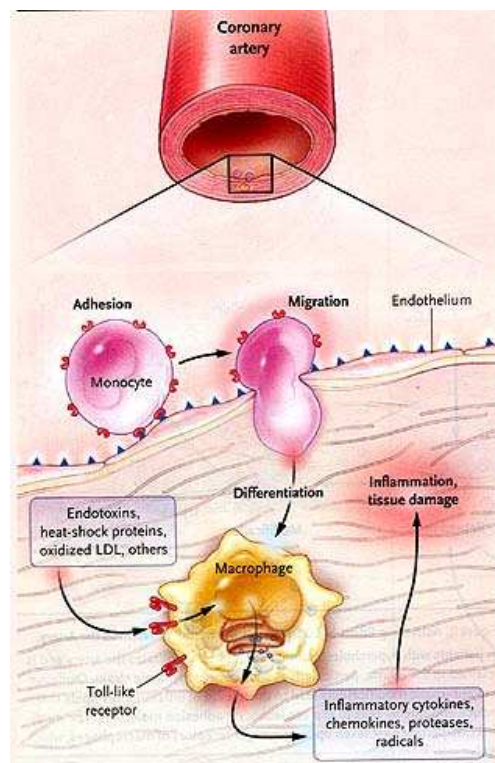


Abbildung 3: Immunrezeptoren als Faktor bei der Entstehung einer Atherosklerose

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Erkennung von Erregern oder deren Bestandteilen durch Komponenten des Immunsystems

Die Einteilung in ein *angeborenes* und ein *erworbenes*, adaptives Immunsystem ist kennzeichnend für höhere Säugetiere und den Menschen. Das *erworbene* Immunsystem beruht auf langfristiger Gedächtnisfunktion, die durch spezifische Antigen erkennende Zellen vermittelt wird. Bis es zur Ausbildung einer adaptiven Immunantwort kommt, kann ein Organismus im Rahmen des angeborenen Immunsystems („engl. „innate immune system“) über spezifische Rezeptoren schnell und effektiv auf mikrobielle Pathogene reagieren. Diese so genannten „pattern recognition receptors“ (PRRs) sind in der Lage, hochkonservierte und nur bei mikrobiellen Pathogenen vorkommende Muster zu erkennen („pathogen associated molecular pattern“, PAMP). Dadurch wird die essentielle Unterscheidung zwischen „infektiösem Nichtselbst“ und „nicht infektiösem Selbst“ ermöglicht (Janeway et al. 2002). Monozytenassoziierte Antigene wie TLR2, TLR4, CD14, CD16 und HLA-DR funktionieren als PRRs in Säugetieren und dem Menschen und spielen eine essentielle Rolle bei der Erkennung mikrobieller Komponenten. Manche Rezeptoren können auch endogene Liganden erkennen, die während der inflammatorischen Antwort induziert werden: Dazu gehören neben Hitzeschockproteinen, extrazellulären Matrixkomponenten auch eine an den IL-1 Rezeptor assoziierte Proteinkinase, die durch Ähnlichkeit der zytoplasmatischen Domänen von TLRs als Signalmolekül genutzt wird. (Akira et al. 2001)

### 2.2 Toll-like Rezeptoren

#### 2.2.1 Die Bedeutung von TLRs in der Immunabwehr

Die Toll-like Rezeptoren (z.Zt. 13 bekannt) bestehen aus einer Domäne mit extrazellulären „leucin-rich repeat“ (LRR) Motiven und einer zytoplasmatischen Domäne, die sogenannte Toll/ Interleukin-1 Rezeptor Domäne (TIR). Diese Rezeptoren erkennen ein sehr breites Spektrum von PAMP. Mikrobielle Komponenten stimulieren die TLR und aktivieren damit verschiedene intrazelluläre Signalpfade. Auf diesem Weg werden Makrophagen aktiviert, antimikrobielle Gene sowie inflammatorische Zytokine induziert. Die Ausreifung dendritischer Zellen wird angeregt. TLR benötigen für ihre Signalwirkung das Adaptormolekül MyD88 (myeloid differentiation factor 88). Mit der Identifizierung eines MyD88-unabhängigen Signalpfades entdeckten Yamamoto et al. drei zusätzliche Adaptorproteine (Yamamoto et al. 2004): TIRAP (in der TIR-Domäne beinhaltetes Adaptorprotein) ist im TLR2/4-MyD88-abhängigen

Signalpfad involviert. TRIF (in der TIR-Domäne beinhalteter, IFN- $\beta$  induzierender Adaptor) und TRAM (TRIF-verwandtes Adaptormolekül) sind beim TLR3/4-MyD88-unabhängigen Pfad zu finden. Außer NF- $\kappa$ B-Aktivierung vermittelt TLR2 in Anwesenheit bakterieller Lipoproteine auch die Synthese eines Vorläufers des proinflammatorischen Zytokins IL1- $\beta$  (Aliprantis, et al. 2000). Darüber hinaus wird durch den Toll-like Rezeptor auch Caspase1 mit dem Ergebnis der Proteolyse und Sekretion von reifen IL1- $\beta$  aktiviert. So vermuteten Aliprantis et al., dass die Caspase-Aktivierung die Antwort des angeborenen Immunsystems auf mikrobielle Pathogene ist, die ihren Höhepunkt in Apoptose und Zytokinproduktion erreicht (Aliprantis et al. 2000). Antimikrobielle Moleküle wie Stickstoffmonoxid (NO) werden ebenfalls über TLR freigesetzt, wie Campos et al. am Beispiel *Trypanosoma cruzi* infizierter Makrophagen zeigten (Campos et al. 2001).

Durch die Induktion dieser kostimulatorischen Moleküle kann die Kapazität der Antigenpräsentation erhöht werden. Die resultierende Immunaktivierung steigert die Wirtsresistenz gegen eine ganze Reihe infektiöser Organismen. Es kann jedoch sein, dass die Immunantworten die Schwelle des Gleichgewichts überschreiten. Ishii et al. gehen davon aus, dass TLR eine wichtige Rolle in der positiven und negativen Regulation von Immunantworten während einer Sepsis spielen (Ishii et al. 2004). Im dynamischen Prozess der Sepsis zeigt sich anfangs eine vermehrte Expression und Sekretion von Zytokinen, wogegen es im Verlauf der schweren Sepsis und eines septischen Schocks zu deren verminderten Expression kommt. Untersuchungen von Salomão et al. zeigten das in experimentellen Modellen beschriebene zeitabhängige Auf- und Abregulieren entzündlicher Antworten innerhalb der klinischen Stufen der Sepsis. Periphere mononukleäre Zellen produzieren zu Beginn einer Sepsis ohne Organdysfunktion oder Schock durch eine Hyperreaktivität auf LPS vermehrt entzündliche Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$ . Bei einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock kommt es trotz hoher LPS-Bindungskapazität auf den mononukleären Zellen zu einer beeinträchtigten Produktion von TNF- $\alpha$ . Allerdings ergab die Untersuchung der Expression von TLR2 und TLR4 auf der Zelloberfläche von Monozyten und Neutrophilen in diesem Fall keinen eindeutigen Zusammenhang im Sinne einer Regulation der Zytokinproduktion durch die Toll-like Rezeptoren (Salomão et al. 2008). Möglicherweise kann bei einer Infektion eine Toleranz gegen bakterielles Lipoprotein durch eine verringerte Aktivierung von TLR2 entstehen. Wang et al. zeigten 2002, dass mit einem synthetischen Lipoprotein vorbehandelte humane Monozyten auf einen zweiten Lipoproteinkontakt mit verringerter TNF- $\alpha$ - und IL6-Produktion reagieren.

Lissauer et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen genetischen Unterschieden in der Expression von TLR und dem Krankheitsverlauf kritisch erkrankter Patienten, die entwe-

der eine Sepsis oder eine sterile Entzündung entwickelten. Dazu wurden Blutproben vor der klinischen Diagnose einer Sepsis untersucht und im Anschluss mit dem Ausgang der Erkrankung verglichen. Es zeigte sich, dass die bei Toll-like Rezeptoren eine Signalkaskade induzierenden Gene bereits 24 Stunden vor einer klinisch möglichen Diagnose der Sepsis vermehrt exprimiert wurden. Da der Verlauf einer Sepsis auch vom frühen Zeitpunkt einer Behandlung abhängt, könnte die Erfassung dieser genetischen Unterschiede ein neues therapeutisches Ziel darstellen (Lissauer et al. 2008).

Toll-like Rezeptoren werden auch auf Nicht-Immunzellen exprimiert und dort nach einer TLR-induzierten Reaktion des Immunsystems hochreguliert. Dadurch aktivierte Endothelzellen können sekundär lokale Makrophageninfiltration und erhöhte vaskuläre Durchlässigkeit bei Infektionen bis hin zum systemischen Sepsissyndrom verursachen (Zhang et al. 1999). Ein effizienter TLR-Antagonist könnte diese „Überaktivierung“ des angeborenen Immunsystems reduzieren (Meng et al. 2004). Auch auf Neuronen und endokrinen Zellen sind TLR zu finden. Sie spielen bei der Vernetzung zwischen Immun- und neuroendokrinen System eine wichtige Rolle. Die TLR-induzierte Zytokinproduktion hat wiederum Wirkung auf endokrine Drüsen und deren Hormonproduktion (Kanczkowski et al. 2008). Überaktivierte Toll-like Rezeptoren, beispielsweise bei chronischer Infektion oder Entzündung im Rahmen einer Autoimmunerkrankung, tragen zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen wie Diabetes oder Tumorgenese endokriner Drüsen wie Schilddrüse und Ovarien bei (Girling et al. 2007). Anders et al. diskutieren einen Zusammenhang zwischen der Pathogenese einer Glomerulonephritis und TLR-Aktivität. Postinfektiöse und Hepatitis-Virus assoziierte Glomerulonephritis ist ein Beispiel dafür, wie Immunantworten auf mikrobielle Pathogene diese Erkrankung beeinflussen können: vier der bislang bekannten 11 (13) TLR (TLR3, TLR7/8, TLR9) erkennen Nukleinsäuren. Die molekularen Mechanismen, die antimikrobielle Immunität mit dieser Erkrankung verknüpfen, sind größtenteils unbekannt. Eine mögliche Erklärung sind die immunstimulatorischen Effekte mikrobieller Antigene und die humoralen Konsequenzen antimikrobieller Immunität. Vor allem TLR3, das auch auf mesangialen Zellen vorkommt, scheint hier eine größere Rolle zu spielen (Anders et al. 2006). Der mikrobielle Kontakt mit Aktivierung der Toll-like Rezeptoren scheint auch Einfluss auf die Entwicklung eines systemischen Lupus Erythematosus (SLE) zu haben. Im Rahmen des immunstimulatorischen Effekts produzierte Autoantikörper können das Risiko für diese Erkrankung erhöhen (Pawar, et al. 2006).

In einer Zusammenfassung diskutierten Ishii et al. 2006 diverse Einsatzmöglichkeiten TLR-modulierender Agenzien zur therapeutischen Applikation. TLR-Agonisten werden z.B. als Adjuvantien für Impfstoffe getestet, während TLR-Antagonisten als antiinflammatorische oder

antiautoimmune Agenzien eingesetzt werden könnten. Monophosphoryl Lipid A als „entgiftete“ Form von LPS (Endotoxin) wird als viel versprechender Impfstoffzusatz geprüft. Dieser TLR-Agonist soll das Immunsystem stimulieren können, ohne durch die proinflammatorischen Effekte des originalen Lipopolysaccharids den Impfling negativ zu beeinträchtigen (Casella et al. 2008). Nephropathogene Bakterien, wie z.B. bestimmte E-coli-Stämme, lösen häufig Harnwegsinfekte aus und können lebensbedrohliche Komplikationen (Urosepsis) verursachen. TLR4 erkennt P-Fimbrien von *Escherichia coli* und veranlasst eine passende Immunantwort, um eine Invasion und Infektion abzuwehren. Damit haben TLR große Bedeutung in der Abwehr von Harnwegsinfekten. Erhöhte Infektionsraten bei für Harnwegsinfekten anfälligen Patienten werden mit TLR-Mutanten in Verbindung gebracht. Mit TLR-modulierenden Agenzien ließe sich der beeinträchtigte Immunabwehrmechanismus korrigieren und die Problematik der durch Antibiotika erzeugten Resistenzen entschärfen (Scherberich et al. 2008).

Ozinsky et al. beschrieben 2000 ein Zusammenspiel verschiedener Mitglieder der TLR-Familie. So koordiniert TLR2 zusammen mit TLR6 bei einer Infektion mit grampositiven Bakterien oder Partikeln von Hefezellwänden (Zymosan) die Makrophagenaktivierung. Die zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren schließen sich zu diesem Zweck zu einem heteromeren Komplex zusammen. Weitere Hinweise auf eine TLR-Kooperation ergeben sich daraus, dass TLR2 einen weiteren Toll-like Rezeptor als Partner benötigt, um die TNF- $\alpha$ -Synthese in Makrophagen zu aktivieren. Ozinsky et al. gehen davon aus, dass die zytoplasmatischen Enden von TLR funktionell, d.h. im Hinblick auf ihre Signalwirkung, verschieden sind. Unterschiedliche TLR-Paare können verschiedene Signalfade aktivieren. Dadurch ist es Makrophagen möglich, ihre Immunantwort auf individuelle Pathogene durch ein spezifisches Muster an Entzündungsmediatoren anzupassen. Nach Asahina et al. sind auch Unterschiede zwischen den Spezies zu finden. So zeigen canines und felines TLR4 eine DNA-Sequenzähnlichkeit von ca. 62-78% mit *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos Taurus* und *Equus caballus*. Die TLR4 Expression war speziesabhängig in den Körpergeweben unterschiedlich hoch (Asahina et al. 2003).

### 2.2.2 *Drosophila* Toll und phylogenetische Aspekte

Aufgrund der evolutionären Konservierung angeborener Mechanismen der Immunabwehr ist *Drosophila* ein ideales Tier, um die genetische Kontrolle der Immunerkennung und –antwort zu untersuchen. Der einzige aktuelle TLR-Vertreter bei *Drosophila* zeigt eindeutige Homologie der zytoplasmatischen Domäne zu den Säugetier-TLRs in Bezug auf die Gruppe von TLR1, -2, -4 und -6 (Du, et al. 2000). Dies lässt vermuten, dass ein altes – prävertebrates – TLR vor 500 Millionen Jahren eine proinflammatorische Funktion übernommen hat. Die TLRs

umfassen eine Gruppe naher phylogenetischer Nachbarn. Nach Schätzungen divergierten TLR1 und -6 von einem gemeinsamen Säugetier-Gen vor 95 Millionen Jahren. TLR4, der aktuelle Endotoxin-Sensor für Vertebraten, erschien als eine Einheit vor 180 Millionen Jahren. TLR3 und -5 divergierten von einem gemeinsamen Gen vor ca. 150 Millionen Jahren, wie auch TLR7 und -8. Sehr wahrscheinlich existierten weniger TLRs während der frühen Säugetierevolution. Toll-like Rezeptoren erkennen verschiedene mikrobielle Komponenten und lösen eine Abwehrreaktion sowohl bei *Drosophila* als auch bei Säugetieren aus (Anderson, et al. 2000). Der „Toll-Pfad“ bei *Drosophila* ist für die Abwehr fungaler Infekte erforderlich (Brennan, et al. 2004). Es kommt zur vermehrten Sekretion fungizider Peptide, beispielsweise Drosomycin. Auch antibakterielle Peptide wie Diptericin gegen gramnegative Bakterien und Defensin gegen grampositive Bakterien werden gebildet (Hoffmann, et al. 1999, Lemaitre, et al. 1996). „Toll“ und ein mit Toll verwandter Rezeptor steuern die fungiziden und antibakteriellen Peptide codierenden Gene (Lemaitre, et al. 1996, Williams, et al. 1997). Die Bedeutung der Toll-Rezeptoren für *Drosophila* zeigt sich bei Mutationen: So kommt es bei Individuen mit Mutationen bei Rezeptor-kodierenden Genen bei mikrobiellen Infektionen zu erheblich verringerten Überlebensraten (Lemaitre, et al. 1996).

1997 wurde ein humanes Homolog des *Drosophila* Toll Proteins charakterisiert, der „Toll-like Rezeptor 4“ – TLR4 (Medzhitov, et al. 1997). Wie *Drosophila* Toll besteht dieser humane Toll-like Rezeptor aus einer extrazellulären und einer zytoplasmatischen Domäne. Sowohl *Drosophila* Toll als auch der IL1-Rezeptor sind bekannt für ihre Signalisierung über NF- $\kappa$ B, einem nukleären transkriptionalen Aktivator multipler Abwehrgene und deren Sequenzen.

### 2.2.3 TLRs und ihre Liganden

#### TLR1

TLR1 kann zusammen mit TLR2 und TLR6 heteromere Komplexe bilden, die schließlich u.a. zur Zytokinproduktion führen. Spezifisches Antigen ist das in Hefen vorkommende Zymosan.

#### TLR2

TLR2 erkennt innerhalb der TLR-Familie das breiteste Spektrum an Liganden. Zu den von TLR2 erkannten PAMP gehören nach Aliprantis et al. (2000) bakterielle Lipoproteine, zum Beispiel diese von *Borrelia burgdorferi* (Hirschfeld, et al. 1999); Glycosylphosphatidylinositol und Glycoinositolphospholipide parasitischer Protozoen wie *Trypanosoma cruzi* (Campos, et al. 2001) und *Toxoplasma gondii* (Kudo, et al. 2004). LPS von *Porphyromonas gingivitis*, das strukturelle Unterschiede zu enterobakteriellem LPS aufweist, wird ebenfalls von TLR2 erkannt (Underhill, et al. 1999). Hirschfeld et al. (2000) vermuteten dagegen, dass die als „endotoxin protein“ bezeichneten hoch bioaktiven Kontaminationen, die in niedrigen Konzen-

trationen in vielen LPS-Präparationen enthalten sind, für die TLR2-Stimulation durch LPS verantwortlich sind und nicht das LPS selbst. Zu weiteren Liganden gehören LAM (Lipoarabinomannan), ein Glycolipid aus der Zellwand von Mykobakterien (Means, et al, 1999), lösliches Peptidoglykan und Lipoteichonsäure als Bestandteil von grampositiven Bakterienzellwänden (Schwandner, et al. 1999, Takeuchi, et al. 1999, Yoshimura, et al. 1999) und Zymosan, ein Zellwandbestandteil von Hefepilzen (Underhill, et al. 1999). MD-2, ein essentielles akzessorisches Protein für TLR4, erhöht bei TLR2 die Sensitivität gegenüber LPS-Strukturen und Lipoteichonsäure und verstärkt die Antwort von TLR2 nach Kontakt mit grampositiven Bakterien und Peptidoglykan (Dziarsky, et al. 2001).

### **TLR3**

TLR3 kommt in hoher Expression im Gewebe von Plazenta und Pankreas auf dendritischen Zellen vor. Der Rezeptor erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA), die von vielen Viren im Verlauf ihrer Replikation synthetisiert wird. Ein Zusammenhang bei der Abwehr von Virusinfektionen liegt nahe. TLR3 ist von dem Adaptormolekül MyD88 unabhängig. Der Signalfaden involviert stattdessen das Adaptormolekül TRIF.

### **TLR4**

Der wichtigste Ligand für TLR4 ist bakterielles Endotoxin. Lipopolysaccharide (LPS) werden jedoch durch den TLR4-Rezeptor nicht allein gebunden, sondern in Zusammenarbeit mit anderen Molekülen. Beteiligt sind unter anderem das LPS-bindende Protein LBP, der CD14-Rezeptor und MD-2, das mit TLR4 an der Zelloberfläche assoziiert ist und ein akzessorisches Protein für TLR4 darstellt (Shimazu, et al. 1999). LBP ist verantwortlich für die Bindung von LPS im Serum und den Transport zum zellwandständigen CD14. Dort wird es direkt vom TLR4/CD14/MD-2-Komplex gebunden (Janeway, et al. 2002). TLR4 erkennt auch Liganden nicht mikrobiellen Ursprungs wie Hitzeschockproteine (HSP) (Ohashi et al. 2000) und zelluläres Fibronektin, bzw. dessen Domäne EDA (Okamura, et al. 2001). Fibronektin spielt eine wichtige Rolle bei physiologischen und pathologischen Prozessen, unter anderem in der Gewebereparatur, der Embryogenese, der Hämostase sowie in der Migration und Adhäsion von Zellen. Die Stimulierung von TLR4 durch die Domäne des Fibronektins ist ebenfalls abhängig von der Koexpression von MD-2. Eine Beziehung von TLR4 zu einer mit durch Typ II Kollagen-Antikörper und LPS ausgelösten Arthritis wird ebenfalls diskutiert (Lee et al. 2005). 2008 zeigten Hodgkinson et al., dass auch Fibrinogen den TLR4-Signalfaden aktiviert. TLR4 wird neben TLR2 und TLR11 mit Harnwegsinfektionen in Verbindung gebracht. Der Rezeptor erkennt P-Fimbrien von *Escherichia coli*, die an Glykolipid-Rezeptoren von Uroepithelien und Nierentubuluszellen binden (Scherberich et al. 2008). Das in der Niere (Henle-



sche Schleife) gebildete Tamm-Horsfall-Glykoprotein übernimmt immunregulatorische Funktion bei Harnwegsinfekten, indem es Zellen des angeborenen Immunsystems über den TLR4-abhängigen Mechanismus aktiviert (Saemann et al. 2005).

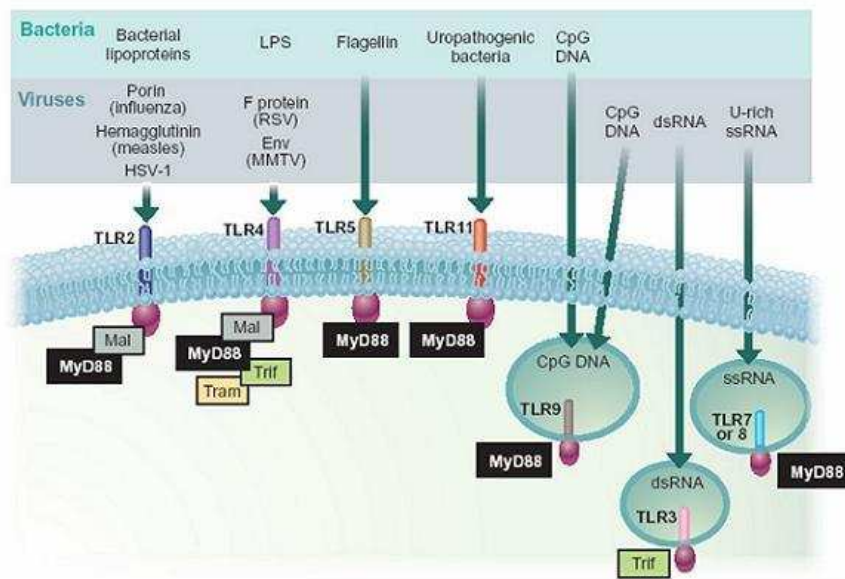


Abbildung 4: Toll-like Rezeptoren, ihr Vorkommen in verschiedenen zellulären Kompartimenten und ihre Liganden

## TLR5

Der Toll-like Rezeptor 5 erkennt bakterielles Flagellin grampositiver und gramnegativer Bakterien (Hayashi et al. 2001).

## TLR6

2000 zeigten Ozinsky et al., dass die zytoplasmatische Domäne von TLR6 zusammen mit der von TLR2 funktionelle Paare bilden kann. Dieser heteromere Komplex erkennt bakterielles Peptidoglykan als Pathogenkomponente. Diese Interaktion führt schließlich zur Zytokinproduktion.

## TLR7 und TLR8

TLR7 und TLR8 erkennen einzelsträngige RNA (ssRNA) sowie kleine synthetische Immunmodulatoren wie Imiquimod (auch TLR8) und Loxoribine (vor allem TLR7) (Akira, et al. 2003). Imiquimod steht in der Diskussion als immuntherapeutisches Agens in der Tumorthherapie: Aktivierte TLR7 und TLR8 initiieren Immunzellen zur Produktion proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine mit der Folge antiviraler und antitumoraler Immunantworten (Smits, et al. 2008). TLR7 und TLR8 sind zusammen mit TLR3 und TLR9 gruppiert, da diese TLR vor allem im endosomalen Kompartiment zu finden sind. Bei Erkennung eines Liganden

durch TLR7 oder TLR8 wird über die TIR-Domäne wiederum der Myeloid differentiation factor (MyD88) aktiviert.

### **TLR9**

DNA von Bakterien hat stimulatorische Effekte auf Säugetier-Immunzellen, die auf der Gegenwart unmethylierter CpG-Dinukleotide (CpG = Deoxycytidylatphosphat-Deoxyguanylat) in bakterieller DNA beruhen. Hemmi et al. zeigten 2000, dass die zelluläre Antwort auf CpG-Motive durch TLR9 hervorgerufen wird. In TLR9-Knockout-Mäusen waren die üblichen Effekte durch CpG-Motive wie Zytokinsekretion, B-Zell-Differenzierung und Reifung dendritischer Zellen nicht feststellbar. Somit ist TLR9 essentiell für die Erkennung bakterieller DNA. Die DNA von Vertebraten hat eine niedrige Frequenz von CpG-Dinukleotiden, die meist methyliert sind und keine immunstimulatorische Aktivität besitzen. Viel diskutiert wird in diesem Zusammenhang das therapeutische Potential von CpG-DNA als Adjuvanz für Impfstoffe gegen Krebs, Allergien und Infektionskrankheiten. Fischer et al. berichteten, dass TLR9 einen Einfluss auf Apoptose innerhalb einer Immunreaktion hat (2005). Eine Untersuchung von Coban et al. zeigt, dass verändertes Hämoglobin, das sog. Hämozoin, im Rahmen einer Malaria-Erkrankung durch Plasmodium falciparum ein neuer „Nicht-DNA“-Ligand für TLR9 ist. Das offensichtlich immunologisch aktive Hämozoin aktiviert das angeborene Immunsystem und führt zur Produktion von Zytokinen, Chemokinen und der verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle. Diese Reaktionen waren bei TLR9<sup>-/-</sup> und MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen stark beeinträchtigt (2005).

### **TLR10**

Untersuchungen von Hasan et al. ergaben, dass TLR10 bei Ratten auf einem Genlokus zu finden ist, der auch TLR1 und TLR6 enthält. Exprimiert als hoch N-glykosyliertes Protein wurde der Rezeptor in B-Zelllinien, B-Zellen aus dem peripheren Blut und in dendritischen Zellen von Tonsillen gefunden. Ein spezifischer Ligand wurde bisher nicht entdeckt. Jedoch verbindet sich TLR10 mit MyD88, dem bekannten Adaptor zwischen Toll- und IL1-Rezeptordomäne (Hasan et al. 2005).

### **TLR11**

Zhang et al. zeigten folgenden Zusammenhang auf: Mäuse ohne TLR11 sind hochempfindlich für Infektionen der Nieren durch uropathogene Bakterien. Dieser Toll-like Rezeptor scheint eine wichtige Rolle bei der Verhütung von Harnwegsinfektionen zu spielen (Zhang et al. 2004). Ein Profilin-ähnliches Protein von Toxoplasma gondii aktiviert TLR11 ebenfalls und reguliert damit; abhängig von MyD88, die Interleukin-12 Produktion (Yarovinsky, et al. 2006).

TLR11 wird als Rezeptor für Bestandteile einzelliger Parasiten diskutiert. Beim Menschen ist TLR11 (12, 13) nicht nachgewiesen.

## **2.3 Endotoxinrezeptor, CD14**

CD14 ist ein multifunktionseller „pleiotroper“ Rezeptor mit einer Molmasse von 48-53 kDa. Der wichtigste Ligand ist bakterielles LPS. Jedoch bindet CD14 auch Proteoglykane und Lipoteichonsäure. Der membranständige Rezeptor ist zu finden auf Monozyten, Makrophagen und in geringerer Konzentration auf Granulozyten und Lymphozyten und kommt auch als lösliches Protein vor (sCD14).

## **2.4 Fc-γ-III Rezeptor, CD16**

CD16 ist Bestandteil proinflammatorischer CD14+Monozyten. Als niedrig-affiner Fc-γ-III Rezeptor bindet CD16 Immunglobuline und Aggregate, assoziiert mit Phagozytoseaktivität. Knock-out Mäuse für CD16 entwickeln keine systemische Vaskulitis, keine Kryoglobulin induzierte Glomerulonephritis und keine toxisch-allergischen Reaktionen. CD14+ CD16++ Monozyten haben gegenüber CD14++ CD16- Zellen eine höhere Expression an MHC-Klasse-II Molekülen, sezernieren größere Mengen proinflammatorischer Zytokine und produzieren den Hauptanteil an TNF im Blut (Nockher und Scherberich 1998, Belge et al. 2002). Diese Subpopulation von Monozyten steht offensichtlich im Zusammenhang mit aktiven entzündlichen Krankheitsphasen. Die Anzahl von CD16+ Monozyten steigt im Rahmen fieberhafter (entzündlicher) Erkrankungen bei Hämodialysepatienten drastisch an und ist als ein „neuer“ und „klinisch praktikabler“ Verlaufssparameter einer, auch klinisch „inapparenten“, Inflammation anzusehen (Nockher und Scherberich 1998).

## **2.5 HLA-DR**

Dieses sog. Human Leucocyte Antigen-System ist assoziiert mit der Antigenerkennung und Prozessierung der Immunantwort. Als MHC-Klasse-II-Molekül ist HLA-DR essentiell für die Funktion des T-Zell-Rezeptors für die monozytäre Interaktion mit T-Zellen.

## **2.6 Monozyten**

### **2.6.1 Morphologische Eigenschaften von Monozyten**

Die in die Gruppe der Leukozyten gehörenden Monozyten sind mit 14-20 µm die größten mononukleären Zellen im Blut. Sie besitzen einen großen, vielgestaltigen Kern (hufeisen- bis nierenförmig, häufig an einem Ende erheblich verdickt, gelappt) mit basophilen Zytoplasma und feinen Granula und Lysosomen. Durch die darin enthaltene Peroxidase und die ver-

schiedenen Säurehydrolasen besitzen diese Zellen mikrobizide Eigenschaften. Monozyten können phagozytieren und sind zur Migration befähigt. Ihre Membranoberfläche besitzt verschiedene Rezeptoren wie CD14, CD16, CD86, CD11c, HLA-DR und die Toll-like Rezeptoren. Blutmonozyten zirkulieren für etwa ein bis drei Tage im Kreislauf, bevor sie aus dem Gefäßsystem auswandern und sich zu gewebetypischen Makrophagen differenzieren.

### **2.6.2 Aufgaben der Monozyten im Rahmen der Infektionsabwehr**

In den Körper eingedrungene Mikroorganismen werden rasch von phagozytierenden Zellsystemen aufgenommen. Zu ihnen gehören neben den neutrophilen Leukozyten des Blutes die in Blut und Geweben vorkommenden mononukleären Monozyten bzw. Makrophagen. Zunächst werden diese Zellen durch Chemotaxis über den Aufbau eines Konzentrationsgradienten zum Ort der pathogenen Keime gelockt. Chemotaktisch wirksame Substanzen sind beispielsweise Proteine aus der Komplementkaskade, Prostaglandine von verletzten Blutgefäßen oder auch der „Platelet Activating Factor“ (PAF) aus Thrombozyten. Die Phagozyten umschließen mithilfe sogenannter Pseudopodien die zu entfernende Einheit (Mikroorganismen, geschädigte Zellen, Antigen-Antikörper-Aggregate) und bauen diese durch die in den Lysosomen enthaltenen Enzyme ab. Die Fähigkeit zur Bindung und Phagozytose wird durch eine molekulare Kennzeichnung der Pathogene über Komplementfaktoren oder Antikörper erleichtert. Das Komplementsystem besteht aus einer Familie von Proteasen, die u. a. durch Monozyten freigesetzt werden können. Monozyten/ Makrophagen tragen Rezeptoren, die Mikroorganismen bzw. deren Produkte spezifisch erkennen. Beispielsweise erkennt der Toll-like Rezeptor 4 das Lipopolysaccharid (LPS) als Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und sendet ein Aktivierungssignal in die Zellen. Die Phagozytoseleistung wird erhöht und es kommt zu einer vermehrten Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL1, IL6 und TNF- $\alpha$ . Zytokine werden u. a. von Monozyten und Makrophagen produziert und bewirken neben einer Entzündungssymptomatik eine Zellaktivierung, damit der unspezifischen Abwehr vermehrt Abwehrzellen zur Verfügung stehen.

Bei der Begrenzung der Entzündungsreaktion sind Monozyten und Makrophagen und durch sie sezernierte Zytokine entscheidend beteiligt. Eine Aktivierung des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierensystem durch IL6 führt zur Ausschüttung von Kortikosteroiden. IL6 aktiviert in der Leber die Akute-Phase-Reaktion. Von dort gelangen die Akute-Phase-Proteine zum Ort der Entzündung und begrenzen diese. Einbezogen ist Fibrinogen, das über eine gesteigerte Gerinnungsneigung lokale Thrombusbildung im Entzündungsgebiet zur Folge hat. Erreger werden so nicht weiter in die Blutbahn ausgeschwemmt. Auch das C-Reaktive Protein gehört in die Gruppe der Akute-Phase-Proteine. Es bindet sich an Erreger (Nekroseproteine, DNA) und erleichtert die Opsonierung durch Phagozyten. Schließlich führt

die Aktivierung des vegetativen Nervensystems zur Sekretion von Acetylcholin und Katecholaminen. Diese Substanzen können Makrophagen inaktivieren und den Entzündungsherd begrenzen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Tabelle 1: Monozytenisolierung

Material	Hersteller
EDTA - Vollblut	
EDTA-S-Monovetten	Sarstedt
Dextran T 500 für die Biochemie	Roth GmbH + Co
Nycoprep™ 1.068	Axis-Shield
Für den Waschpuffer:	
Albumin (BSA)	PAN Biotech GmbH
Natriumchlorid krist. zur Analyse	Merck
Titriplex III zur Analyse	Merck
Aqua dest.	

Tabelle 2: Zellkultur

Material	Hersteller
Platten: Nunclon™ surface	NUNC™, Apogent
LPS von Escherichia coli, Serotyp 0128:B12	Sigma®
Für das Zellkulturmedium:	
RPMI 1640, ohne L-Glutamin, mit 2,0g/l NaHCO <sub>3</sub>	PAN Biotech GmbH
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH
200 mM L-Glutamin	PAN Biotech GmbH
CO <sub>2</sub> -Brutschrank Heraeus	Kendro Laboratory Products

Tabelle 3: Antikörper und Flowzytometrie

Material	Hersteller
CD14 FITC (anti-human)	Becton Dickinson
Anti - HLA-DR PE	Becton Dickinson
CD16 PE-Cy5 (anti-human)	Becton Dickinson
TLR2 PE (anti-human)	eBioscience
TLR4 PE (anti-human)	eBioscience

Cellwash-Lösung	Becton Dickinson
Cellfix 1:10 verdünnt	Becton Dickinson
Fix & Perm®:	
Fixation Medium, Reagent A	CALTAG Laboratories
Permeabilization Medium, Reagent B	CALTAG Laboratories
FACS Flow, Trägerflüssigkeit	Becton Dickinson
Durchflusszytometer, FACScan	Becton Dickinson
Software update	CellQuest™

Tabelle 4: Untersuchte Substanzen

Substanz	Hersteller
<b>Erythropoietin:</b>	
Epoetin alpha, ERYPO®FS	Cilag AG, Schweiz
NESP, Aranesp®	Amgen
<b>Bisphosphonate:</b>	
Ibandronsäure, Bondronat®	Roche, UK
<b>Glucocorticoide:</b>	
Prednisolon, Solu-Decortin®	Merck KGaA, Deutschland
<b>Statine:</b>	
Atorvastatin, Sortis®	Pfizer, USA
<b>Lipoproteine</b>	
LDL, e-LDL	Geschenk von Prof. S. Bhakdi, Univ. Mainz
<b>Vitamin D:</b>	
Alphacalcidol, Eins-Alpha®, Vitamin D <sub>3</sub> -Derivat	Leo Pharmaceutical Products Ltd., Dänemark
Calcitriol, Calcijex®	Abbott Laboratories Ltd., Kanada
<b>Xanthinderivate:</b>	
Pentoxifyllin, Trental®	Aventis Pharma Deutschland GmbH

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolierung peripherer Blutmonozyten

Das von freiwilligen gesunden informierten Spendern ( $n = 33$ ) gewonnene EDTA-Vollblut wurde innerhalb von 30 Minuten in Falcon-Tubes mit einem Fassungsvermögen von 50ml verbracht. Nach der Zugabe von 10% Dextran (8% Dextran in 0,9% NaCl) inkubierte das Gemisch für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit waren die Erythrozyten sedimentiert. Aus dem so gewonnenen leukozytenreichen Plasma wurden nach einer Methode von Boyum (1984) die Blutmonozyten isoliert. Dafür wurde ein leicht hyperosmotisches, einen Gradienten aufbauendes Medium mit dem leukozytenreichen Plasma überschichtet. Lymphozyten und Monozyten weisen zu geringe Dichteunterschiede auf, um eine zufriedenstellende Separierung dieser beiden Zelltypen allein über den Parameter Dichte zu erreichen. Durch eine erhöhte Osmolarität des Trennmediums (Nycoprep® 1.068) verlieren die Zellen Wasser, schrumpfen und weisen anschließend eine höhere Dichte auf. Da Lymphozyten auf Osmolaritätsveränderungen deutlicher reagieren als Monozyten, wird so der Dichteunterschied verstärkt und die Zelltrennung bei der Zentrifugation effektiver. Das Trennmedium Nycoprep® 1.068 bestand aus Nycodenz® ( $C_{19}H_{26}J_3N_3O_9$ ), NaCl und Tricine-NaOH.

Die folgende Dichtegradienten-Zentrifugation bei 1800 rpm für 20 Minuten ohne Bremse separierte die Monozyten von den Lymphozyten und Granulozyten. Anschließend wurden die vorsichtig entnommenen Monozyten (weiße Phase) zur Entfernung u.a. der Blutplättchen dreimal mit einem selbst hergestellten kalten Waschpuffer bei 800 rpm für 10 Minuten gewaschen. Die isolierten Zellen wurden durch eine Lebend-Tot-Färbung mit Trypan-Blau auf Vitalität (>99%) getestet sowie auf Reinheit durch eine flowzytometrische Untersuchung (>70% Monozyten).

Für die Analysen lagen entsprechende positive Ethikvoten vor.

### 3.2.2 Zellkultur

Das verwendete Kulturmedium Rosewell Park Memorial Institut (RPMI) 1640 mit 2,0g/l NaHCO<sub>3</sub> wurde ergänzt durch 10% Fetales Kälberserum (FCS) und 200 mM L-Glutamin. Dieses Hydrogencarbonat-Puffersystem basierte auf einer Lösung von Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen. Als Indikator für den pH-Wert war Phenolrot zugesetzt. Die Zugabe fetalen Kälberserums (inaktiviert bei 56°C für 30 Minuten) lieferte den Zellen Wachstumsfaktoren, Spurenelemente und Hormone. Die isolierten Monozyten wurden in diesem Kulturmedium suspendiert und mit einer Dichte von etwa  $2 \cdot 10^5$  Zellen in 24 Well-Kulturplatten verbracht. Diese Kurzzeitzellkulturen verblieben bis zu 5 Tage bei 36,5 °C im CO<sub>2</sub>-Begasungs-



Brutschrank. In den Versuchsansätzen erfolgte die Stimulation der Monozyten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten. Ein Anteil der zu stimulierenden Monozyten wurde in den ersten 24 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS) beschickt. Nach Ablauf dieser Zeitspanne erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums und die Zugabe der zu untersuchenden Substanz in verschiedenen Dosierungen. Bei einem zweiten Ansatz inkubierten die Zellen die gesamte Zeit der Zellkultur mit der zu untersuchenden Substanz. Parallel dazu wurde LPS (100 ng/ml) nach 24 Stunden zugegeben. Bei der Untersuchung der Lipoproteine LDL und e-LDL wurden nur unstimulierte Monozyten verwendet. In bestimmten zeitlichen Abständen erfolgte eine Messung der zu untersuchenden Oberflächenantigene. Zu diesem Zweck wurden nach Entfernung der Überstände die adhärennten Monozyten aus den Kulturplatten entnommen. Dies geschah mittels eines Puffers (0,9% NaCl, 10 mmol EDTA, pH 7,2), dem die Zellen für 20 Minuten auf Eis ausgesetzt waren. Das Abnehmen der Zellen erfolgte durch mehrmaliges Pipettieren des Puffers. Die Versuchsansätze wurden in Serie jeweils zwei- bis dreimal wiederholt.

### **3.2.3 Untersuchte Substanzen**

Alle verwendeten Medikamente außer Statin waren Lösungen für die intravenöse bzw. subkutane Injektion. Die Herstellung der verschiedenen Dosierungen erfolgte über eine Verdünnung in dem Kulturmedium, das auch für die Zellkultur selbst verwendet wurde.

Das eingesetzte Lipoprotein e-LDL wurde mit Plasmin und Cholesterinesterase hergestellt und mit LDL in Kooperation mit den Kliniken der Johannes Gutenberg-Universität von Herrn Prof. Dr. S. Bhakdi, Abteilung Mikrobiologie, zur Verfügung gestellt.

### **3.2.4 Aufbereitung und Markierung der Monozyten aus der Zellkultur**

Die, wie oben beschrieben, aus der Kulturplatte entnommenen Monozyten wurden mit einem Waschpuffer bei 230 g für 5 Minuten gewaschen und der Überstand verworfen. Mit jeweils 20 µl des entsprechenden monoklonalen Antikörpers in einem Reagenzglas versetzt, inkubierten die Monozyten eines Wells ( $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml) nach kurzem „Vortexen“ für 15 Minuten unter Lichtabschluß. Bei der Untersuchung des intrazellulären TLR4-Anteils kamen noch ein Fixierungsschritt mit anschließender Permeabilisierung der Zellmembran und TLR4-Inkubation unter Lichtabschluß hinzu. Anschließend wurden die Zellen erneut mit Waschpuffer bei 230 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Fixierung der Zellen mit einer Paraformaldehydlösung (1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt) konnte die Suspension nach kurzem „Vortexen“ mittels Durchflussszytometer und unter Zuhilfenahme der CellQuest™ Software analysiert werden.

### 3.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Mittels Durchflusszytometer (FACS -> Fluorescence Activated Cell Sorter) lassen sich Zellen verschiedenster Herkunft auftrennen und einordnen. Die zu untersuchenden Zellen können nach ihrer Granularität, Größe und ihrer Oberflächenproteine nach unterteilt werden. Granularität und Größe beeinflussen die Lichtstreuung. Mit einem Laser als Lichtquelle lassen sich die Zellen in der Flowzytometrie (Durchflusszytometrie) nach diesen Eigenschaften auftrennen. Die Analyse der Oberflächenproteine basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt wird. Die zu untersuchenden Zellen werden über ein Ansaugsystem in eine Messkammer geleitet, dort vereinigt sich die Suspension mit der laminar fließenden Trägerflüssigkeit. Der Probenstrom erfährt eine Beschleunigung um das hundertfache der Grundgeschwindigkeit, während er auf das Zentrum der Messküvette zufließt. Diesen Vorgang nennt man hydrodynamische Fokussierung. Sie garantiert, dass jede Zelle der Probe zuverlässig einzeln gemessen wird.

Im Durchflusszytometer (Abbildung 5) befindet sich ein luftgekühlter Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Mit diesem Laser können Fluoresceinisothiocyanat- (FITC), Phycoerythrin- (PE) und Phycoerythrin-Cyochrome5 (PE-Cy5) markierte Zellen angeregt werden. FITC emittiert nach Anregung elektromagnetische Strahlen der Wellenlänge 519 nm, PE 578 nm und PE-Cy5 670 nm. Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörper. Eine gleichzeitige Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, jedoch über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

Photoverstärker nehmen die Fluoreszenz- und Streuungssignale auf und verstärken diese elektronisch. Die Auswertung erfolgte über eine spezielle Software (CellQuest, BD).

Zur Erfassung der CD14 CD16-Zellen sowie deren Expression von HLA-DR, TLR2 und TLR4 wurden folgende Antikörper-Kombinationen eingesetzt:

- CD14 FITC & HLA-DR PE & CD16 PE-Cy5
- CD14 FITC & TLR2 PE & CD16 PE-Cy5
- CD14 FITC & TLR4 PE & CD16 PE-Cy5

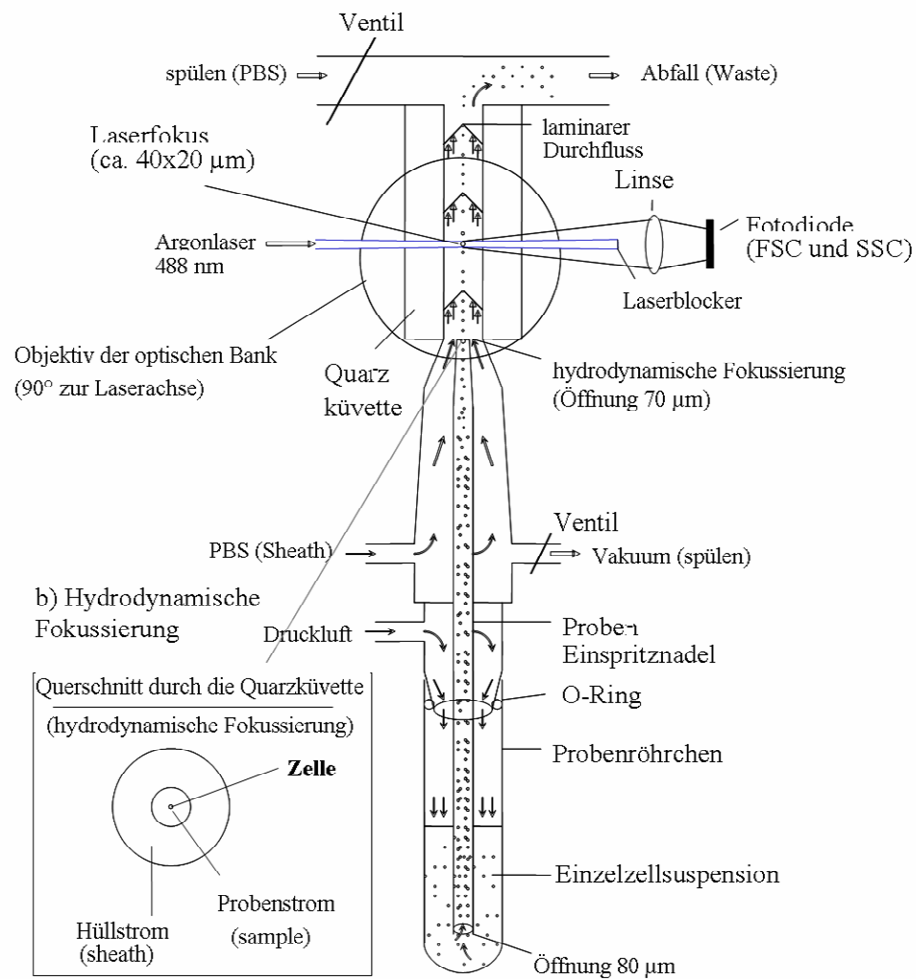


Abbildung 5: Quarz-Küvetten-Einheit, Quelle: Universität Mainz

Als Isotypkontrolle (Negativkontrolle) diente ein Antikörper gleichen Isotyps, der an keiner Zelloberflächenstruktur spezifisch bindet.

### 3.2.6 Zellsortierung im FACS nach Zellgröße und Granularität

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt zunächst als „Dot-Plot“ (Punkthistogramm), wobei die Größe und Granularität der Zellen im Vorwärts und Seitwärtsstreulicht gegenübergestellt werden. Diese Zelleigenschaften beeinflussen die Lichtstreuung im FACS. Dadurch kommt es für die einzelnen Zellpopulationen zu einer charakteristischen Streuung des Lichts. Die Lichtstreuung ist am größten im Kleinwinkelbereich ( $0-10^\circ$ ) des einfallenden Lichtstrahls. Dieses Vorwärtsstreulicht, das sog. „Vorwärtsgitter“ (Forward Angle Light Scatter, FSC), gibt Aufschluss über die Zellgröße: Ein geringerer Teil des Lichts streut seitwärts (ca.  $90^\circ$ ). Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) liefert Informationen über die Granularität und äußere Form der Zellen. Somit lassen sich bei diesem Verfahren die drei großen Leukozytengruppen unterteilen: Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten.

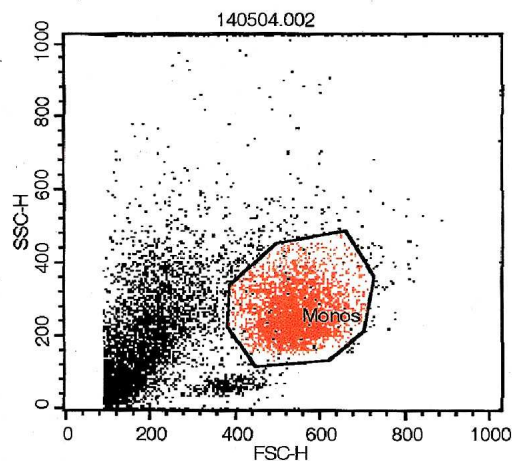


Abbildung 6: „Dot-Plot“ Histogramm mit Monozytengate, Lymphozytenwolke und Zelltrümmern

Die isolierten Monozyten lassen sich durch das Setzen von sog. Fenstern (Gates) von noch vereinzelt vorkommenden Lymphozyten und Granulozyten sowie von Zelltrümmern eindeutig abgrenzen.

### 3.2.7 Differenzierung im FACS nach definierten Oberflächenantigenen

Zur Unterscheidung der verschiedenen Monozytensubpopulationen werden die zu untersuchenden Oberflächenantigene mit den oben beschriebenen monoklonalen Antikörpern besetzt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Mit Hilfe der Antikörper gegen das CD14- und CD16-Epitop lassen sich so die zu untersuchenden Monozyten folgendermaßen differenzieren: hoher CD14 und niedriger CD16 Anteil/ hoher CD16 und niedriger CD14 Anteil. Anhand dieser Aufteilung errechnet sich der Anteil von CD14++ CD16- zu CD14-CD16++ und die Gesamtexpression von CD14 und CD16. Die HLA-DR -, TLR2 - und TLR4-

Expression wird für die drei Subpopulationen der Monozyten (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>-</sup> CD16<sup>++</sup> Zellen) sowie die Gesamtexpression erstellt.

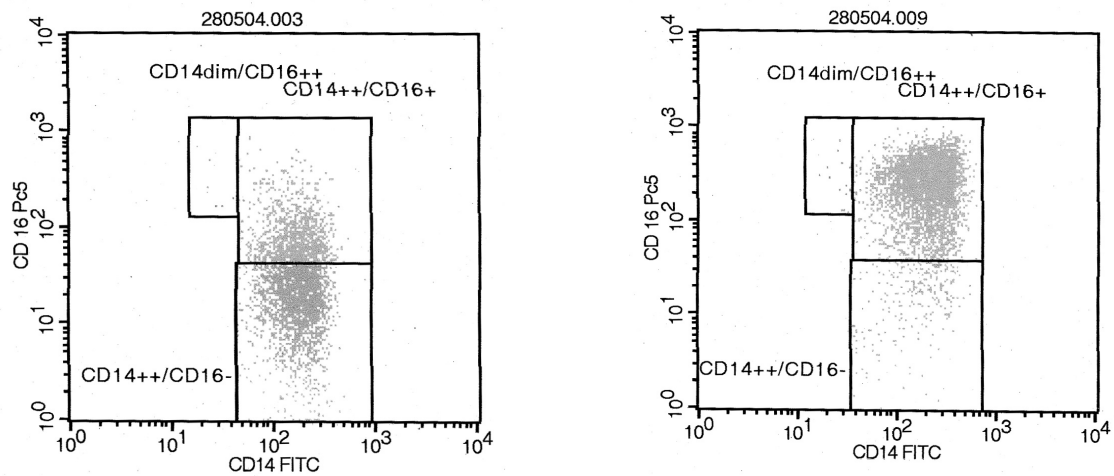


Abbildung 7: Beispiel für eine Verschiebung des CD14<sup>++</sup> Rezeptors zugunsten des FC-γ-III-Rezeptors CD16, Monozytenkultur (LPS-Inkubation rechts)

### 3.2.8 Statistische Methoden

Die im Ergebnisteil dargestellten Daten sind Mittelwerte aus drei repräsentativen Versuchen mit jeweils dreifachem Versuchsansatz. Die Messwerte lagen je Versuch sehr eng zusammen bei gleichzeitig hoher Zahl an Probanden (n=33) und Versuchsansätzen. Auch die Expressionsveränderungen waren trotz Individualität der Spender (z.T. unterschiedlich hohe Grundwerte) vergleichbar und wiederholbar. Zur Anwendung gelangten ausschließlich sog. nichtparametrische Tests (Mann-Whitney-Test, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms SPSS, zuletzt der Version 14.0. Als Signifikanzgrenze wurde  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 4 Eigene Untersuchungen

### 4.1 Allgemeine Analysen ohne Pharmaka

#### 4.1.1 Spontanverlauf der Rezeptorexpression über die Kulturzeit

Die untersuchten Rezeptoren zeigten im vorliegenden Versuchsaufbau deutliche Veränderungen ihrer Expression. Ein Vergleich der zahlreichen Kontrollansätze untereinander verdeutlichte die spezifische Rezeptorexpression im Verlauf der Kulturzeit. Der Spontanverlauf der monozytären Expression von CD14, CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4 veränderte sich im untersuchten Zeitraum in charakteristischer Weise. Ebenso fand sich bei den Kontrollansätzen der mit LPS stimulierten Monozyten eine Veränderung der Rezeptorexpression. Ausnahmen waren vereinzelte Spender, bei denen die Reaktion der Rezeptoren auf das bakterielle Lipopolysaccharid einen gegenteiligen Effekt hatte. Bei wenigen Ansätzen fand sich eine „überschießende“ Expression.

Die folgenden Ergebnisse beruhen auf den Daten der Kontrollansätze aller Versuche. Ausgenommen wurden ein paar vereinzelte extrem hohe Messsignale, deren Hintergrund unklar bleibt.

##### 4.1.1.1 CD14 und CD16

Die monozytäre Expression von CD14 sowie von CD16 stieg im Verlauf der Zellkultur langsam, aber kontinuierlich an. Der Effekt weist auf eine sich spontan verstärkende Expression des Rezeptormoleküls CD14 hin (Abbildungen 8-11).

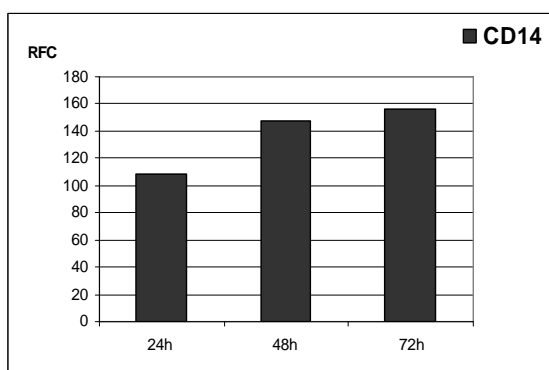


Abbildung 8: Spontanverlauf des Rezeptors CD14 während der Kultivierung ( $p < 0,01$ )

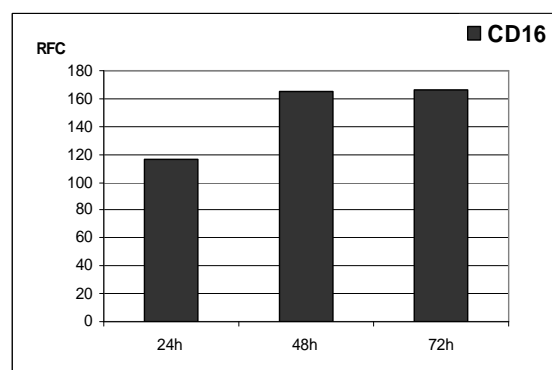


Abbildung 9: Spontanverlauf des Rezeptors CD16 während der Kultivierung ( $p < 0,01$ )

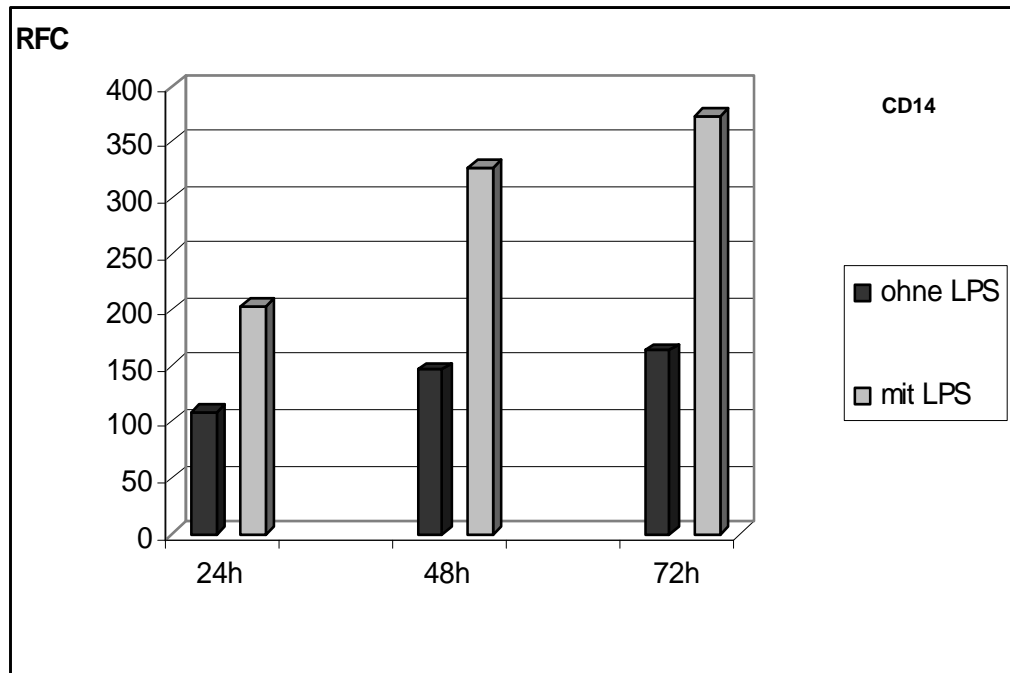


Abbildung 10: CD14 Expression unstimulierter und mit LPS stimulierter Monozyten im Verlauf der Zellkultur ( $p < 0,001$ )

Durch den Kontakt mit LPS wurden Monozyten stimuliert. Die Rezeptorexpression von CD14 (äquivalent von CD16) derart aktivierter Monozyten stieg im Vergleich zu unstimulierten Zellen signifikant an. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Zellkultur, war auch bei den mit LPS beschickten Monozyten eine Erhöhung der Expression von CD14 und CD16 zu beobachten.

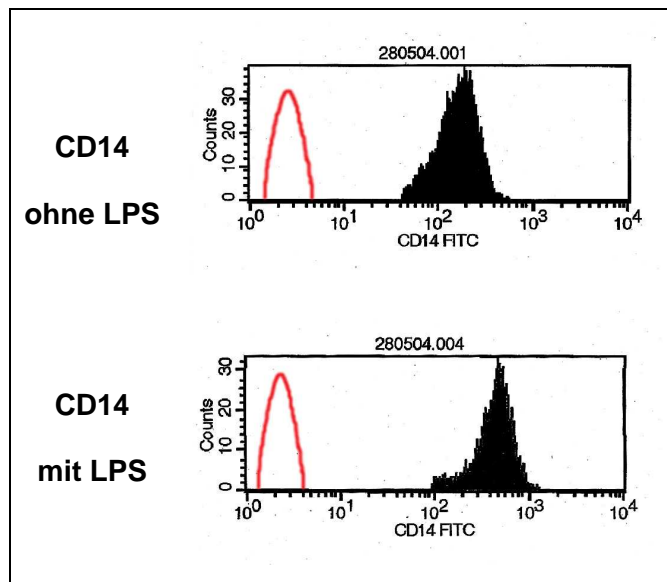


Abbildung 11: LPS-induzierter Shift der monozytären CD14-Expression zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden, LPS regulierte CD14 in Kultur nach oben ( $p < 0,01$ ), rote Linie: schematische Darstellung der Isotypkontrolle

#### 4.1.1.2 HLA-DR

Bei unstimulierten Monozyten stieg die Expression von HLA-DR während der Dauer der Zellkulturzeit kontinuierlich und deutlich an. LPS hemmte dagegen die Expression des HLA-DR-Rezeptors. Ein deutlich zu beobachtende Abregulierung der Rezeptorexpression im Vergleich zu unstimulierten Monozyten war die Folge (Abbildungen 12-13).

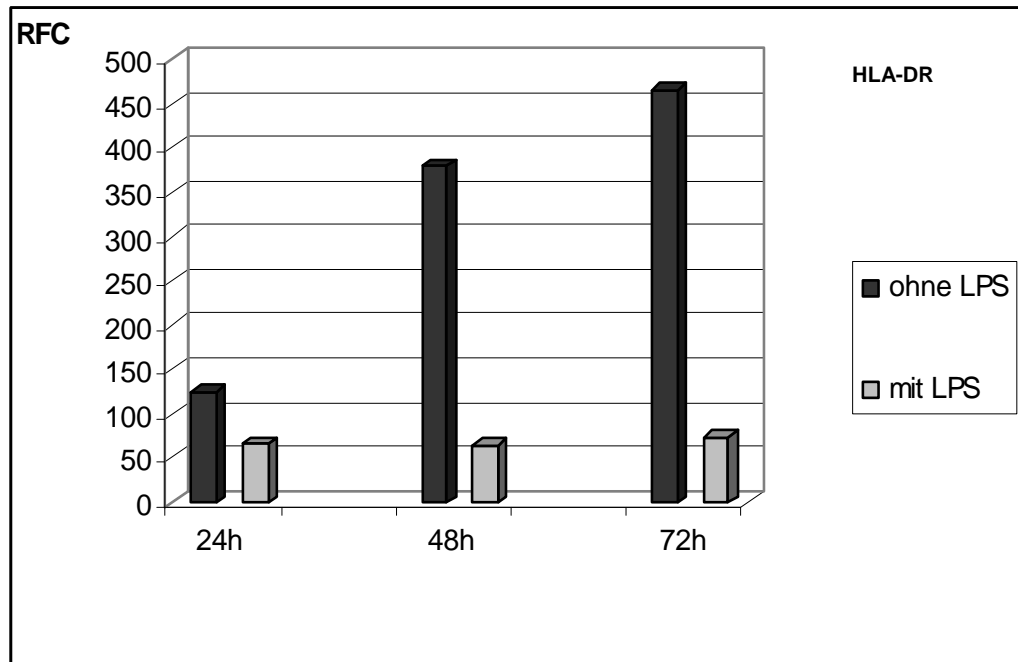


Abbildung 12: HLA-DR Expression unstimulierter und mit LPS stimulierter Monozyten. Dramatische Abregulation von HLA-DR unter LPS-Einfluss ( $p < 0,0001$ )

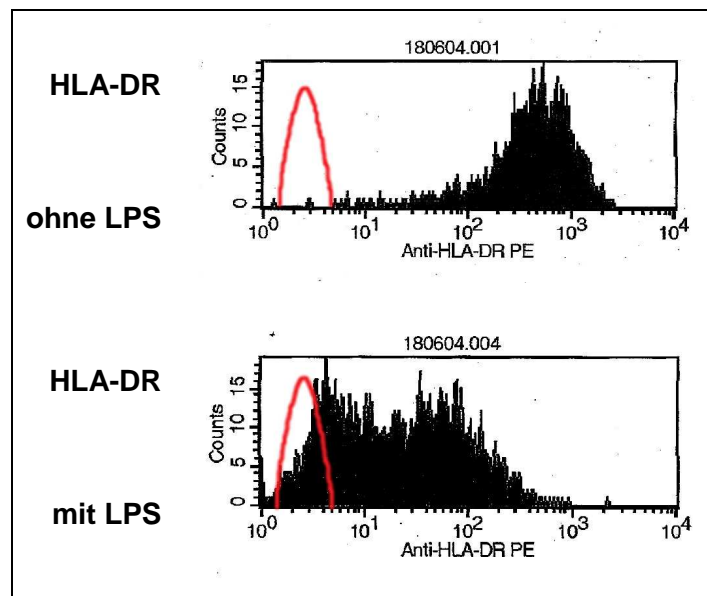


Abbildung 13: LPS-induzierter Shift monozytärer HLA-DR-Expression zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden, LPS regulierte HLA-DR in Kultur nach unten, rote Linie: schematische Darstellung der Isotypkontrolle



#### 4.1.1.3 TLR2 und TLR4

Charakteristisch für die Rezeptoren TLR2 und TLR4 war deren initialer Anstieg zu Beginn der Zellkultur bis zum Messzeitpunkt nach 48 Stunden, begleitet vom anschließendem Abfall der Expression. Dieser Effekt fand sich konstant sowohl bei unstimulierten als auch mit bakteriellem Lipopolysaccharid stimulierten Monozyten. LPS interagiert bei den vorliegenden in vitro-Versuchen mit der Expression von TLR2. Der TLR4-Rezeptor zeigte am Anfang der Kulturzeit kaum Unterschiede und reagierte auf LPS erst zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden wie der TLR2-Rezeptor mit einer Abregulation (Abbildungen 14-15).

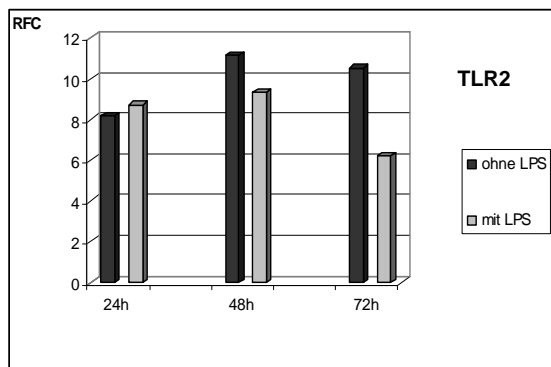


Abbildung 14: Expression des TLR2-Rezeptors bei unstimulierten und mit LPS stimulierten Monozyten, Abregulation von TLR2 durch LPS ( $p < 0,05$ )

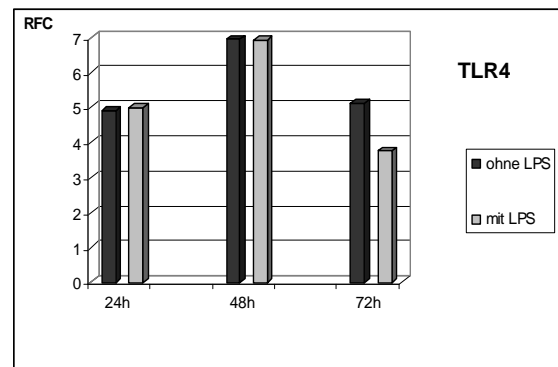


Abbildung 15: Expression des TLR4-Rezeptors bei unstimulierten und mit LPS stimulierten Monozyten

#### 4.1.2 CD14<sup>++</sup>, CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> und CD16<sup>++</sup> im Vergleich

Sowohl die monozytären Subpopulationen CD14<sup>++</sup>, als auch CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> und CD16<sup>++</sup> (Abbildung 87) reagierten nach Inkubation mit bakteriellem Lipopolysaccharid. Der Hauptteil der Zellen trug sowohl CD14 als auch CD16. Den geringsten Anteil stellten Monozyten, die vor allem CD16 exprimieren (Abbildung 16).

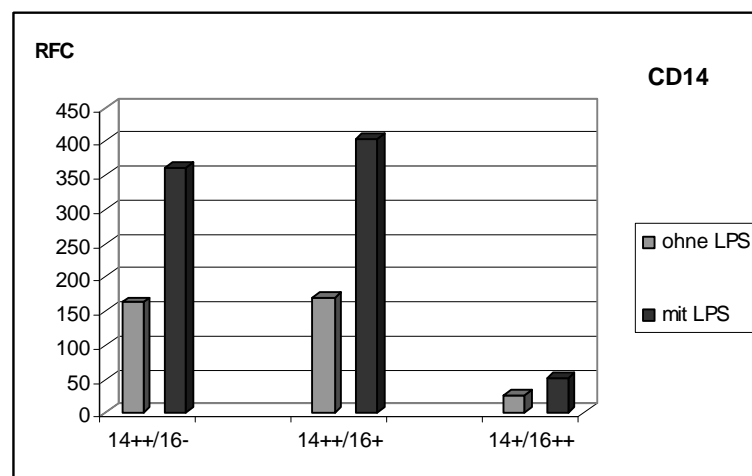


Abbildung 16: CD14 Expression auf den drei Hauptsubpopulationen vor und nach Endotoxin-Exposition ( $p < 0,001$ )

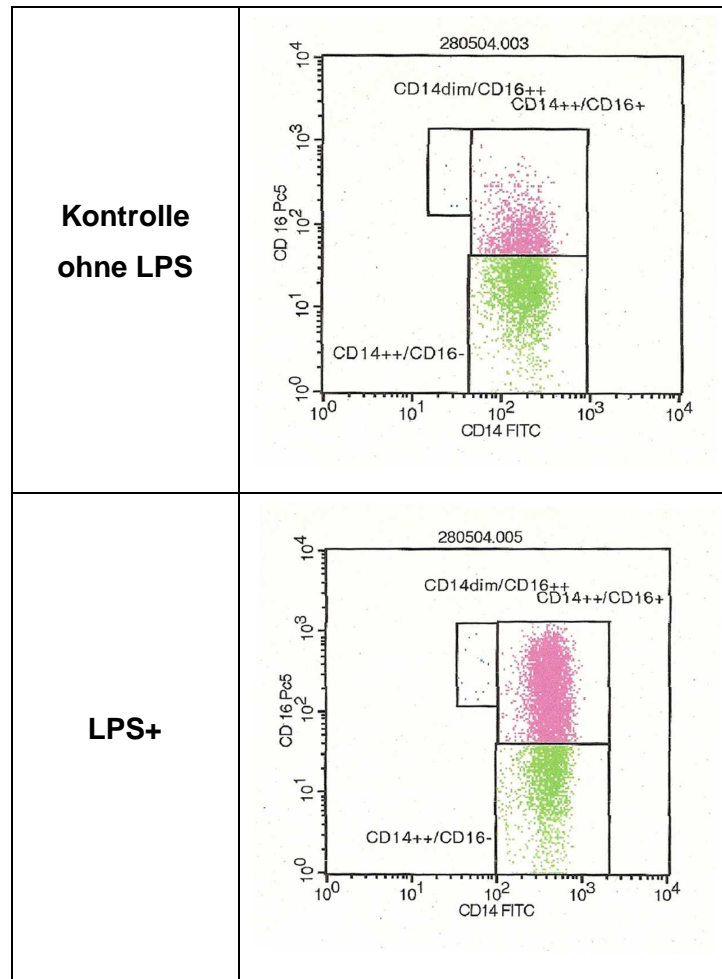


Abbildung 17: Scatter-Diagramm mit Darstellung des Einflusses von LPS auf Subpopulationen der Monozyten in vitro: CD14+ (Rechtsverschiebung) und CD16+ (Verschiebung nach oben) werden vermehrt exprimiert.

Die Expression von CD14+ Zellen erhöhte sich nach Kontakt mit LPS. Zudem exprimierten CD14+ Zellen unter LPS zunehmend den niedrig-affinen Fc-gamma III Rezeptor CD16.

Die oben zu sehende Scatter-Darstellung des Flowzytometers (Abbildung 17) zeigt diese Veränderungen: Eine Verschiebung der Zellwolke nach rechts kennzeichnet die vermehrte Expression von CD14. Die gleichfalls vermehrte Ausprägung des CD16+ Subtyps durch LPS ist durch eine nach oben wandernde Zellwolke zu erkennen.

#### 4.1.3 TLR2 und TLR4 auf den Subpopulationen

Im Verlauf der Kulturzeit nahm die Expression der Muster-Erkennungsrezeptoren TLR2 und TLR4 auf den monozytären Subpopulationen CD14++, CD14+ CD16+ und CD16++ zu. Die folgenden Diagramme sind Ergebnisse des Messzeitpunktes nach 72 Stunden. Abnehmende TLR2 und TLR4 Expression nach LPS-Kontakt fanden sich auf allen Subpopulationen mit einer Ausnahme: Der TLR2-Rezeptor reagierte auf der Subpopulation CD14+ CD16++ nach LPS-Exposition mit einer erhöhten Expression (Abbildungen 18-19).

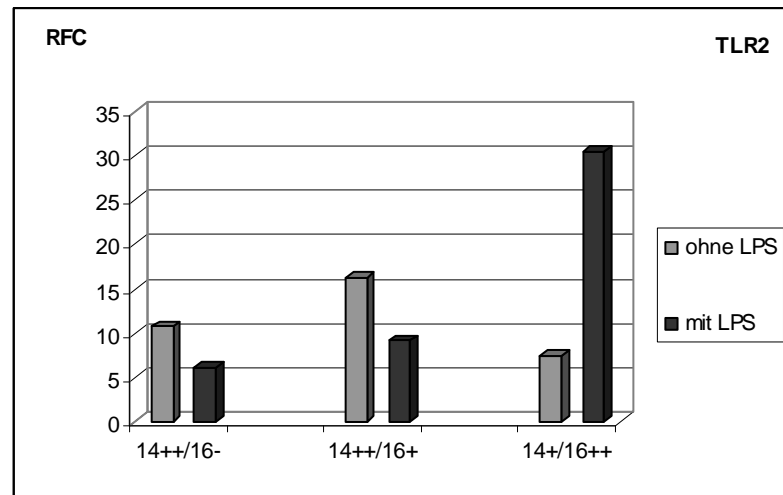


Abbildung 18: TLR2-Expression der drei Haupt-Subpopulationen von Blutmonozyten nach 72 Stunden. Hochregulation von TLR2 auf der CD16++ Subpopulation unter LPS Einfluss.

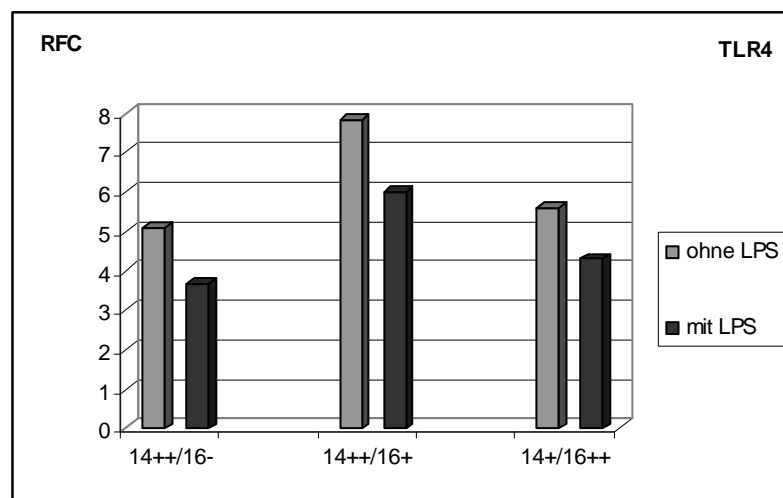


Abbildung 19: TLR4-Expression der drei Haupt-Subpopulationen von Blutmonozyten nach 72 Stunden. Keine signifikante Beeinflussung der TLR4 Expression unter LPS auf den drei Monozytensubpopulationen.

## 4.2 Pharmaka

### 4.2.1 Erythropoietin (EPO): Epoetin alpha und NESP

#### 4.2.1.1 Einfluss von EPO auf Monozytenantigene (in vitro)

Epoetin alpha kam in den Dosierungen 50 IE/ml und 100 IE/ml zum Einsatz.

Tabelle 5: Modulation der Expression monozytärer Antigene unter dem Einfluss von Epoetin alpha

Epoetin alpha	Versuch	Expression der Antigene (mit LPS vorinkubiert)	Expression der Antigene (LPS erst nach der Zugabe von Epoetin)
<b>CD14++</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt	nicht konstant (vermindert/ vermehrt, Spendervarianz!)
	Epoetin alpha mit unstimulierten Monozyten	vermindert, ausgeprägter in höherer Dosierung, am deutlichsten nach 72 Stunden	vermehrt beim Messzeitpunkt „48 Stunden“/ anschließend vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend	abfallend
	Epoetin alpha mit stimulierten Monozyten:	vermindert, ausgeprägter in höherer Dosierung	vermehrt beim Messzeitpunkt „48 Stunden“/ anschließend vermindert Spender mit verminderter Expression bei stimulierten Monozyten zeigt deutliche und dauerhaft erhöhte Expression mit Epoetin alpha
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	meist abfallend (2 von 3)	steigend
<b>CD16+</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt	nicht konstant (vermindert/ vermehrt, Spendervarianz!)
	Epoetin alpha mit unstimulierten Monozyten	vermindert, ausgeprägter in höherer Dosierung	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	mäßiger Anstieg	nicht konstant
	Epoetin alpha mit stimulierten Monozyten	vermindert, ausgeprägter in höherer Dosierung	Spender mit verminderter Expression bei stimulierten Monozyten zeigt deutlich erhöhte Expression mit Epoetin alpha, einmal vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	meist abfallend (2 von 3)	nicht konstant

Epoetin alpha	Versuch	Expression der Antigene (mit LPS vorinkubiert)	Expression der Antigene (LPS erst nach der Zugabe von Epoetin)
HLA-DR	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert	vermindert
	Epoetin alpha mit unstimulierten Monozyten	vermehrt, ausgeprägter in höherer Dosierung	vermindert deutlich erst zum Messzeitpunkt „72 Stunden“
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend	steigend
	Epoetin alpha mit stimulierten Monozyten	vermehrt, am deutlichsten beim Messzeitpunkt „72 Stunden“	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	mäßiger Anstieg	steigend
TLR2	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert	nicht konstant (vermindert/vermehrt, Spendervarianz!)
	Epoetin alpha mit unstimulierten Monozyten	vermehrt, ausgeprägter in niedrigerer Dosierung	nicht konstant (vermindert/vermehrt, Spendervarianz!), deutlich jeweils erst zum Messzeitpunkt „72 Stunden“
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend	nicht konstant (vermindert/vermehrt, Spendervarianz!)
	Epoetin alpha mit stimulierten Monozyten	vermehrt gegen Messzeitpunkt „72 Stunden“, ausgeprägter in höherer Dosierung	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	abfallend	sinkend
TLR4	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert	nicht konstant (vermindert/vermehrt, Spendervarianz!)
	Epoetin alpha mit unstimulierten Monozyten	vermehrt gegen Messzeitpunkt „72 Stunden“, ausgeprägter in höherer Dosierung, im Verlauf der Zellkultur zunehmend dosisunabhängig	vermehrt, deutlicher in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	abfallend	abfallend
	Epoetin alpha mit stimulierten Monozyten	vermehrt gegen Messzeitpunkt „72 Stunden“, ausgeprägter in höherer Dosierung, im Verlauf der Zellkultur zunehmend dosisunabhängig	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	abfallend	abfallend

## Epoetin alpha und die Expression von CD14 auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:

Die Expression von CD14 auf unstimulierten Monozyten stieg im Verlauf der Zellkultur langsam an. Nach Inkubation der Zellen mit Epoetin alpha verminderte sich deutlich dosisabhängig die Expression von CD14. Die Gegenwart von LPS allein induzierte eine Erhöhung des membrangebundenen CD14 im Verlauf der Zellkultur. Durch Epoetin alpha wurde jedoch CD14 auch in mit LPS vorinkubierten Monozyten nach unten reguliert. Somit kam es durch Epoetin alpha insgesamt zu einer Verminderung der CD14-Expression (Abbildungen 20-21).

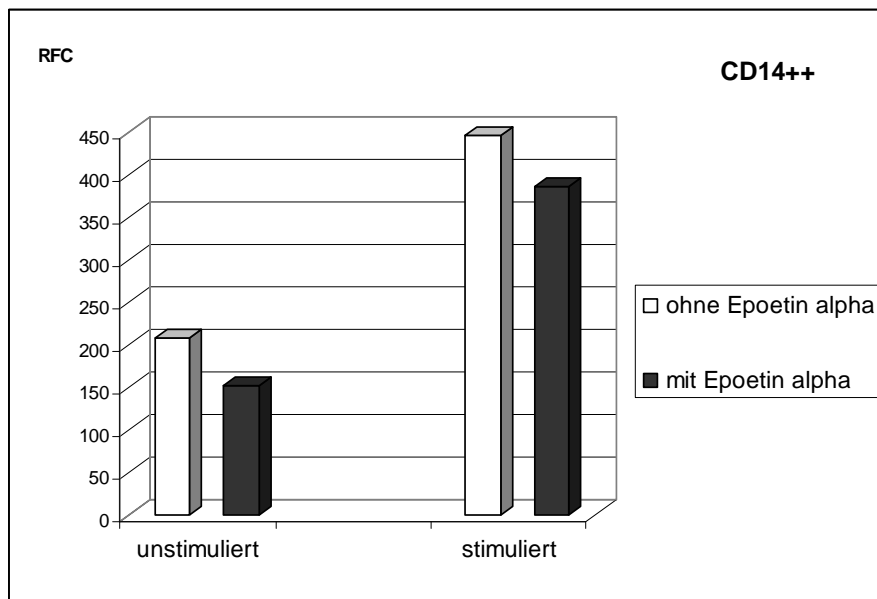


Abbildung 20: Expression von CD14++ unstimulierter und LPS stimulierter Monozyten zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden unter verschiedenen Erythropoietin-Konzentrationen.

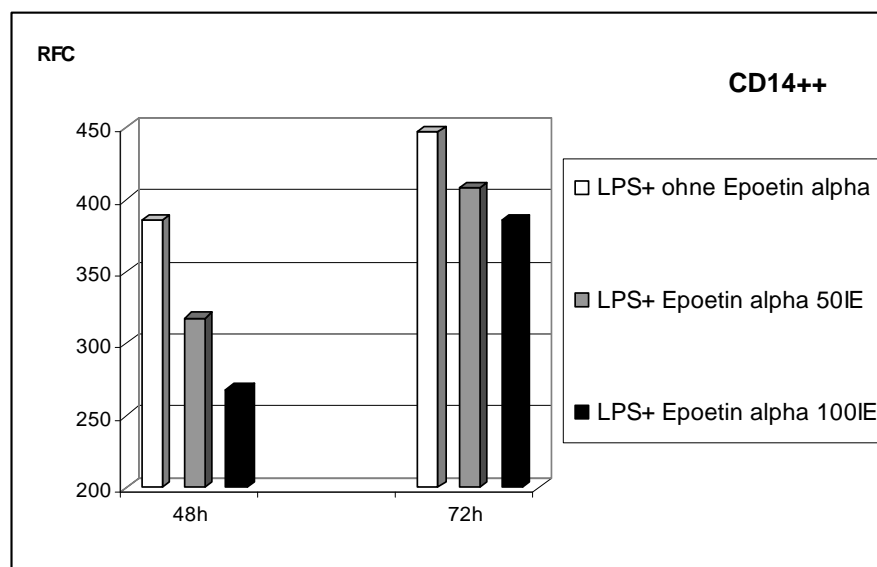


Abbildung 21: Expression von CD14++ LPS stimulierter Monozyten und nachfolgender Inkubation mit EPO

### Effekt von Epoetin alpha auf die Expression von CD16:

CD16 reagierte wie CD14 mit einer dosisabhängigen Verminderung der Expression unter dem Einfluss von Epoetin alpha. Dieser Effekt ließ sich sowohl bei unstimulierten als auch mit LPS stimulierten Monozyten feststellen.

### Effekt von Epoetin alpha auf die Expression von HLA-DR:

Bei unstimulierten Monozyten stieg die Expression von HLA-DR während der Dauer der Zellkultur kontinuierlich an. Die Expression von HLA-DR wurde unter dem Einfluss von Epoetin alpha vermehrt, ausgeprägter in höherer Dosierung. Die potente Hemmung der HLA-Expression durch LPS wurde durch Epoetin alpha gegenläufig beeinflusst. Es kam zu einem nicht sehr ausgeprägtem, aber regelmäßigem Anstieg der HLA-DR-Expression im Verlauf der Zellkultur (Abbildungen 22-23).

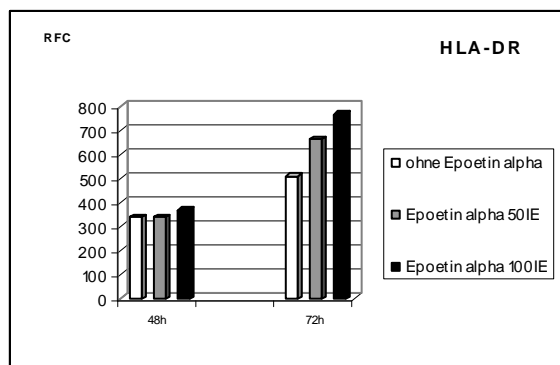


Abbildung 22: HLA-DR-Expression unstimulierter Monozyten

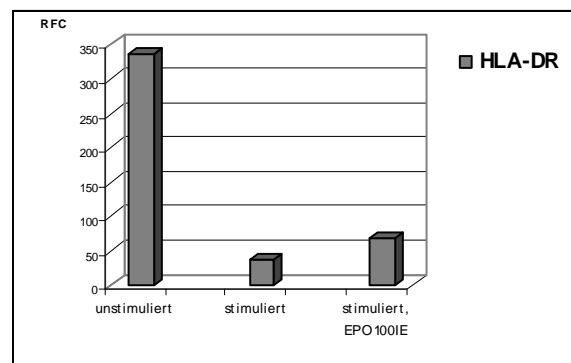


Abbildung 23: HLA-DR-Expression stimulierter Monozyten zum Messzeitpunkt nach 48 Stunden

### Expression von HLA-DR auf Monozyten mit Epoetin alpha-Vorinkubation und späterer LPS-Exposition:

Im Gegensatz zur vermehrten HLA-DR-Expression durch Epoetin alpha bei Vorinkubation mit LPS fiel bei Epoetin alpha-Vorinkubation und späterer LPS-Exposition die HLA-DR-Expression sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Monozyten.

### TLR2- und TLR4-Expression unter dem Einfluss von Epoetin alpha:

Die unstimulierte monozytäre Expression von TLR2 und TLR4 erhöhte sich unter dem Einfluss von Epoetin alpha, für TLR4 allerdings erst gegen Ende der Zellkulturzeit (Messzeitpunkt nach 72 Stunden). Je niedriger die Dosis war (50 IE), desto mehr TLR2 wurde exprimiert. Die TLR4-Expression war jedoch bei der höheren Dosierung ausgeprägter, mit einer im Verlauf der Zellkultur zunehmenden Dosisunabhängigkeit. Wurden Monozyten mit LPS vorbehandelt, stieg unter Epoetin alpha-Einfluss die Expression von TLR2 und TLR4 ebenfalls an, jedoch bei beiden Rezeptoren erst am Ende der Zellkultur zum Messzeitpunkt nach

72 Stunden. Die Gesamtexpression der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 sank im Verlauf der Zellkultur ab dem Messzeitpunkt nach 48 Stunden langsam ab. Ausnahme war der zeitlich steigende Verlauf von TLR2 bei unstimulierten Monozyten unter dem Einfluss von Epoetin alpha (Abbildungen 24-27).

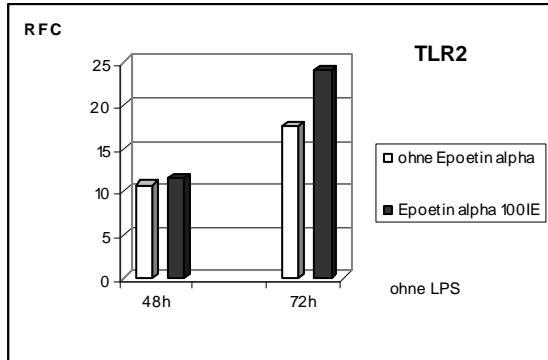


Abbildung 24: Expression von TLR2 bei unstimulierten Monozyten, Mittelwert aus zwei Versuchen

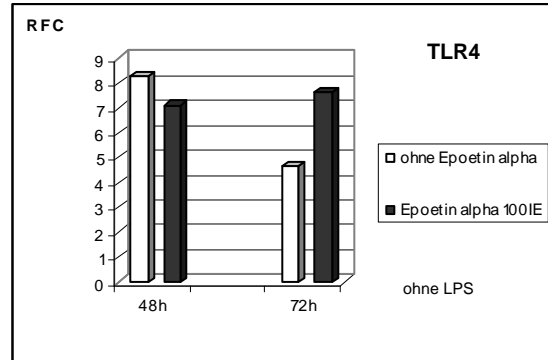


Abbildung 25: Expression von TLR4 bei unstimulierten Monozyten, Mittelwert aus zwei Versuchen

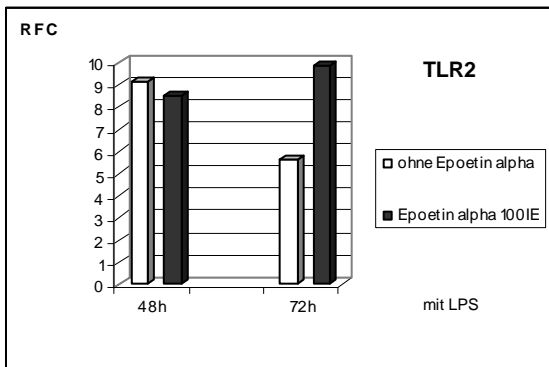


Abbildung 26: Expression von TLR2 bei LPS-stimulierten Monozyten, Mittelwert aus zwei Versuchen

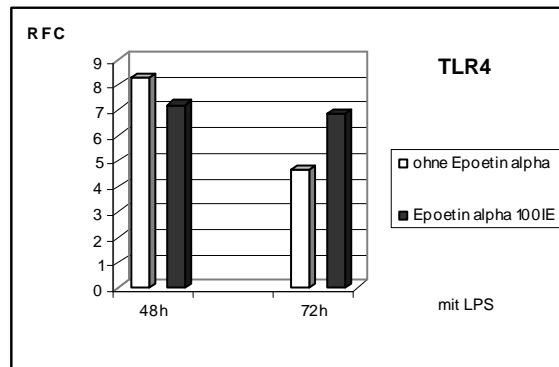


Abbildung 27: Expression von TLR4 bei LPS-stimulierten Monozyten, Mittelwert aus zwei Versuchen

### Expression von TLR2 und TLR4 auf Monozyten mit Epoetin alpha-Vorinkubation und späterer LPS-Exposition:

Insgesamt kam es nach Epoetin alpha-Vorinkubation zu einer Verminderung der Expression von TLR2 und TLR4 bei stimulierten Monozyten im Gegensatz zum anderen Versuchsaufbau mit LPS-vorinkubierten Zellen. Die Reaktion unstimulierter Monozyten war für TLR2 und TLR4 bei beiden Versuchansätzen identisch. Es kam zu einer Erhöhung der Expression.



#### 4.2.1.2 Einfluss von NESP auf Monozytenantigene (in vitro)

NESP kam in den Dosierungen 2 µg/ml, 6 µg/ml und 12 µg/ml zum Einsatz.

Tabelle 6: Modulation der Expression monozytärer Antigene unter dem Einfluss von NESP

NESP	Versuch	Expression der Antigene (stimuliert = mit LPS vorinku- biert)	Expression der Antigene (stimuliert = LPS erst nach der Zugabe von NESP)
<b>CD14++</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt	vermehrt
	NESP mit unstimulierten Monozyten	vermindert	vermindert, keine eindeutige Dosisabhängigkeit
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	ohne NESP steigend/ mit NESP unverändert	steigend
	NESP mit stimulierten Monozyten	vermindert	nicht konstant
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	ohne NESP steigend/ mit NESP unverändert	steigend
<b>CD16+</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt	vermehrt
	NESP mit unstimulierten Monozyten	vermindert, dosisabhängig	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	ohne NESP steigend/ mit NESP abfallend	steigend
	NESP mit stimulierten Monozyten	vermindert, dosisabhängig	nicht konstant
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	ohne NESP steigend/ mit NESP abfallend	steigend
<b>HLA-DR</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert	vermindert
	NESP mit unstimulierten Monozyten	nicht konstant	Tendenz zu vermehrter Expression, nicht konstant
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend	ohne NESP steigend/ mit NESP nicht konstant
	NESP mit stimulierten Monozyten	nicht konstant	vermehrt
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend	nicht konstant
<b>TLR2</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	nicht konstant	vermindert
	NESP mit unstimulierten Monozyten	nicht konstant	vermehrt, keine deutliche Dosisabhängigkeit

NESP	Versuch	Expression der Antigene (stimuliert = mit LPS vorinku- biert)	Expression der Antigene (stimuliert = LPS erst nach der Zugabe von NESP)
	zeitlicher Verlauf der Expres- sion bei unstimulierten Mono- zyten	nicht konstant	nicht konstant
	NESP mit stimulierten Mono- zyten	vermindert, deutlicher in höherer Dosie- rung	nicht konstant
	zeitlicher Verlauf der Expres- sion bei stimulierten Monozy- ten	abfallend	sinkend
<b>TLR4</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	nicht konstant	vermindert
	NESP mit unstimulierten Monozyten	vermindert in höherer Dosie- rung, erhöht in niedrigerer Dosierung	vermehrt, keine deutliche Dosisabhän- gigkeit
	zeitlicher Verlauf der Expres- sion bei unstimulierten Mono- zyten	nicht konstant	ohne NESP abfallend/ mit NESP nicht konstant
	NESP mit stimulierten Mono- zyten	vermindert, deutlicher in höherer Dosie- rung	leichte Erhöhung der Expres- sion beim Messzeitpunkt „48 Stunden“, bei „72 Stunden“ keine eindeutigen Verände- rungen
	zeitlicher Verlauf der Expres- sion bei stimulierten Monozy- ten	abfallend	abfallend

Insgesamt ließ sich für NESP tendenziell ein ähnlicher Einfluss auf CD14, CD16 und HLA-DR feststellen wie für EPO. Die Verschiebungen der Expression waren jedoch geringer. Für TLR2 und TLR4 ließen sich keine eindeutigen Effekte belegen, die einen Vergleich mit EPO zuließen. Möglicherweise bringen weiterführende Versuche mit höheren Dosierungen von NESP mehr Klarheit.

## 4.2.2 Bisphosphonate: Ibandronsäure

### Einfluss von Ibandronat auf Monozytenantigene (in vitro)

Ibandronat kam in den Dosierungen  $10^{-10}$  M/ml und  $10^{-12}$  M/ml zum Einsatz.

Tabelle 7: Modulation der Expression monozytärer Antigene unter dem Einfluss von Ibandronat

Iban- dronat	Versuch	Expression der Antigene (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)
<b>CD14++</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt
	Ibandronat mit unstimulierten Monozyten	vermindert, ausgeprägter in niedrigerer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend
	Ibandronat mit stimulierten Monozyten	vermindert, ausgeprägter in niedrigerer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend
<b>CD16+</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt
	Ibandronat mit unstimulierten Monozyten	vermindert, keine Dosisabhängigkeit
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend
	Ibandronat mit stimulierten Monozyten	keine eindeutige Reaktion
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend
<b>HLA-DR</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert
	Ibandronat mit unstimulierten Monozyten	vermindert in niedrigeren Dosierungen, bei $10^{-6}$ M/ml erhöhte Expression
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend
	Ibandronat mit stimulierten Monozyten	keine eindeutige Reaktion
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend
<b>TLR2</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert
	Ibandronat mit unstimulierten Monozyten	keine eindeutige Reaktion
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ anschließend sinkend
	Ibandronat mit stimulierten Monozyten	keine eindeutige Reaktion

Ibandronat	Versuch	Expression der Antigene (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	vermindert
TLR4	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert
	Ibandronat mit unstimulierten Monozyten	vermehrt
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ anschließend abfallend
	Ibandronat mit stimulierten Monozyten	leicht erhöht, deutlicher in niedrigerer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ anschließend abfallend

### Ibandronat und die Expression von CD14 auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:

Bei der Inkubation unstimulierter Monozyten mit Ibandronat wurde eine Verminderung der Expression von CD14++ beobachtet, die in niedrigerer Dosierung ausgeprägter stattfand (Abbildung 28). Bei mit LPS stimulierten Monozyten wurde eine nur geringfügige Verminderung der Expression festgestellt. Auch hier ergab die niedrigere Dosierung den wirkungsvolleren Effekt (Abbildung 29).

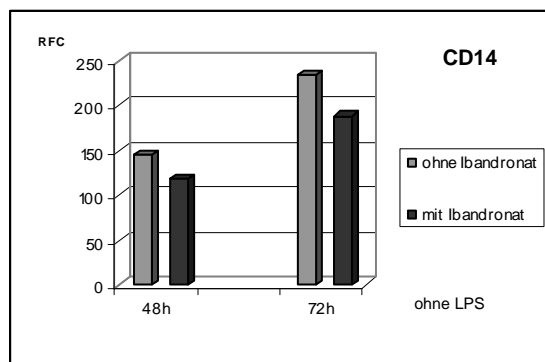


Abbildung 28: Expression von CD14++ unstimulierter Monozyten unter Bisphosphonat

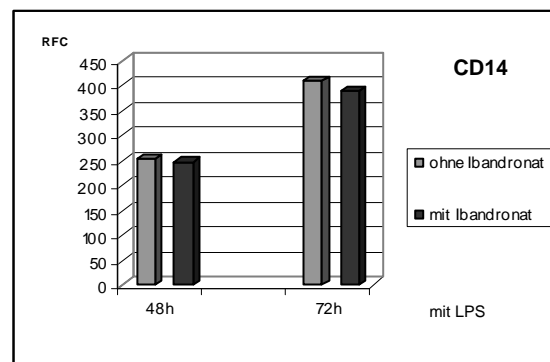


Abbildung 29: Expression von CD14++ stimulierter Monozyten unter Bisphosphonat

### Ibandronat und die Expression von CD16 auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:

Die Expression von CD16 bei unstimulierten Monozyten war nach Inkubation mit Ibandronat vermindert. Im Gegensatz zu CD14 ließ sich jedoch keine Dosisabhängigkeit feststellen. Der CD16-Rezeptor wies bei mittels LPS stimulierten Monozyten keine eindeutige Reaktionen auf.

### Ibandronat und die Expression von HLA-DR auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:

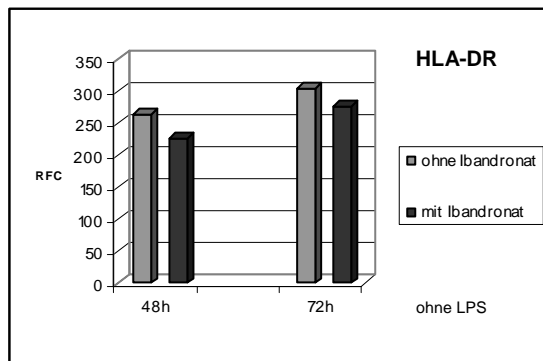


Abbildung 30: Expression von HLA-DR unstimulierter Monozyten unter Bisphosphonat

Zugabe von Ibandronsäure zu unstimulierten Monozyten verminderte HLA-DR Expression. In der höchsten verwendeten Dosierung kam es dagegen zur erhöhten Expression von HLA-DR (Abbildung 30). Bei mit LPS inkubierten Zellen ergaben sich keine eindeutigen Veränderungen.

### Ibandronat und die Expression von TLR2 und TLR4 auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:

Für den TLR2-Rezeptor konnten keine eindeutigen Ergebnisse beobachtet werden. TLR4 reagierte auf Ibandronsäure mit einer vermehrten Expression sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Monozyten. Bei mit LPS aktivierten Zellen war der Effekt in niedriger Dosierung weniger ausgeprägt.

### 4.2.3 Glucocorticoide: Prednisolon

#### Einfluss von Prednisolon auf Monozytenantigene (in vitro)

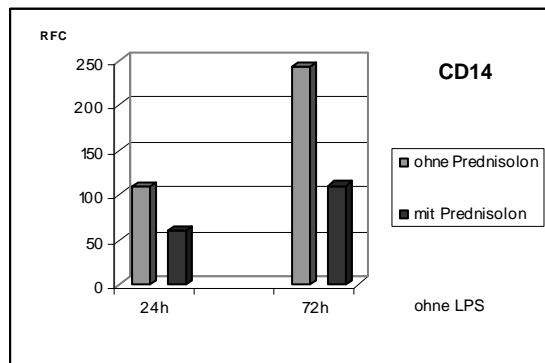
Prednisolon kam in den Dosierungen  $10^{-4}$  M/ml,  $10^{-6}$  M/ml und  $10^{-8}$  M/ml zum Einsatz.

Tabelle 8: Modulation der Expression monozytärer Antigene unter dem Einfluss von Prednisolon

Prednisolon	Versuch	Expression der Antigene (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)	Expression der Antigene (stimuliert = LPS erst nach der Zugabe von Prednisolon)
<b>CD14++</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt	vermehrt
	Prednisolon mit unstimulierten Monozyten	vermindert, deutlicher in höherer Dosierung	vermindert, deutlich in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ anschließend abfallend	steigend
	Prednisolon mit stimulierten Monozyten	vermindert, deutlicher in höherer Dosierung	vermehrt, deutlicher in niedrigerer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	nicht konstant	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“, anschließend sinkend
<b>CD16+</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt	vermehrt
	Prednisolon mit unstimulierten Monozyten	vermindert, deutlicher in höherer Dosierung	vermindert, nur in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	nicht konstant	abfallend
	Prednisolon mit stimulierten Monozyten	vermindert, deutlicher in höherer Dosierung	vermehrt bei niedrigerer Dosierung, vermindert bei höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“, anschließend sinkend
<b>HLA-DR</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert	vermindert
	Prednisolon mit unstimulierten Monozyten	vermindert in höherer Dosierung	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	nicht konstant	steigend

Prednisolon	Versuch	Expression der Antigene (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)	Expression der Antigene (stimuliert = LPS erst nach der Zugabe von Prednisolon)
	Prednisolon mit stimulierten Monozyten	geringfügige Verminderung	geringfügige Verminderung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	abfallend mit Prednisolon/ steigend ohne Prednisolon	steigend
TLR2	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert	geringfügige Erhöhung
	Prednisolon mit unstimulierten Monozyten	deutliche Erhöhung, deutlicher in höherer Dosierung	vermehrt, deutlicher in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend mit Prednisolon/ abfallend ohne Prednisolon	steigend mit Prednisolon/ abfallend ohne Prednisolon
	Prednisolon mit stimulierten Monozyten	vermehrt, deutlicher in höherer Dosierung	vermehrt
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	abfallend	abfallend
TLR4	Stimulation der Monozyten mit LPS	nicht konstant	vermindert
	Prednisolon mit unstimulierten Monozyten	vermehrt, deutlich beim Messzeitpunkt „72 Stunden“	vermehrt, deutlicher in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend, in höherer Dosierung später wieder abfallend	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“, anschließend abfallend
	Prednisolon mit stimulierten Monozyten	vermindert, deutlicher in höherer Dosierung	vermehrt, deutlicher in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	abfallend	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“, anschließend abfallend

## Prednisolon und die Expression von CD14 und CD16 auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:



Durch Prednisolon kam es zu einer verminderten Expression von CD14 und auch von CD16 bei unstimulierten Monozyten (Abbildung 31-32). Je höher die eingesetzte Dosierung, desto ausgeprägter war dieser Effekt.

Abbildung 31: CD14 Expression unstimulierter Monozyten. Abregulation von CD14 unter Prednisolon ( $p < 0,001$ )

Bei mit LPS vorinkubierten Monozyten verminderte sich die Expression von CD14 und CD16 signifikant (Abbildung 33). Wieder war die Höhe der Dosis ausschlaggebend für das Ausmaß der Expression: Je höher die Dosis, desto ausgeprägter der Abfall der CD14 und CD16 Expression (Abbildung 35). Monozyten, die zu Beginn der Zellkultur mit Prednisolon beschickt wurden und bei denen die LPS-Exposition später erfolgte, zeigten vermehrte Expression von CD14 und CD16 (Abbildung 34). Jedoch war diese Vermehrung der Expression umso ausgeprägter, je niedriger die Dosierung von Prednisolon war (Abbildung 36). Für CD16 kam es nur in höherer Dosierung zu einer verminderten Expression (Abbildung 37-38).

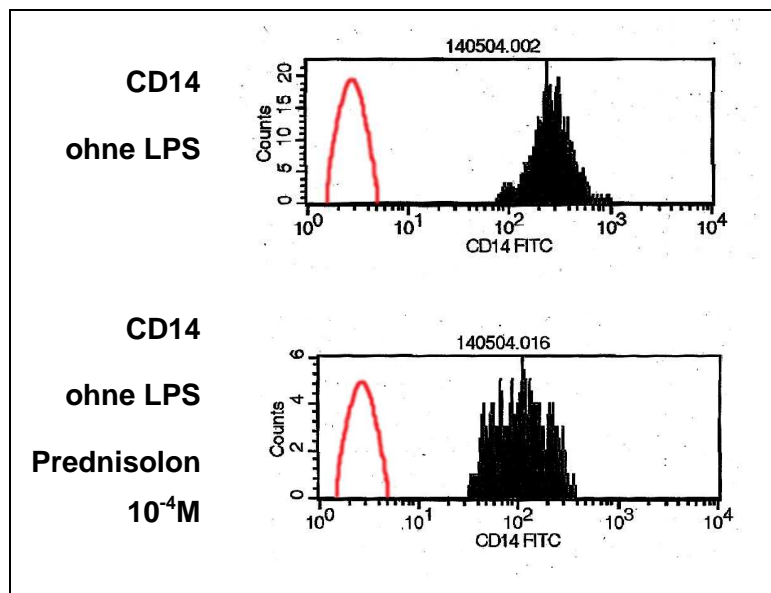


Abbildung 32: Prednisolon-induzierter Shift der CD14-Expression unstimulierter Monozyten zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden, rote Linie: schematische Darstellung der Isotypkontrolle



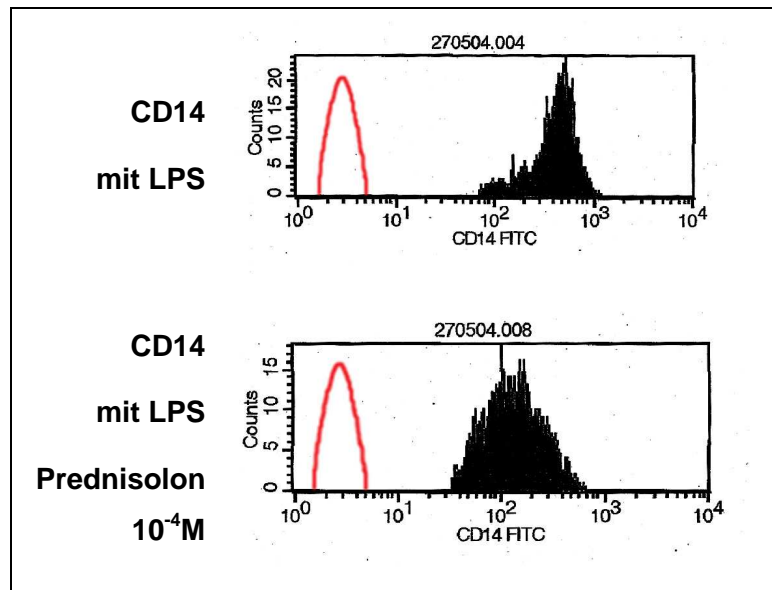


Abbildung 33: Prednisolon-induzierter Shift der CD14-Expression stimulierter Monozyten zum Messzeitpunkt nach 48 Stunden, rote Linie: schematische Darstellung der Isotypkontrolle

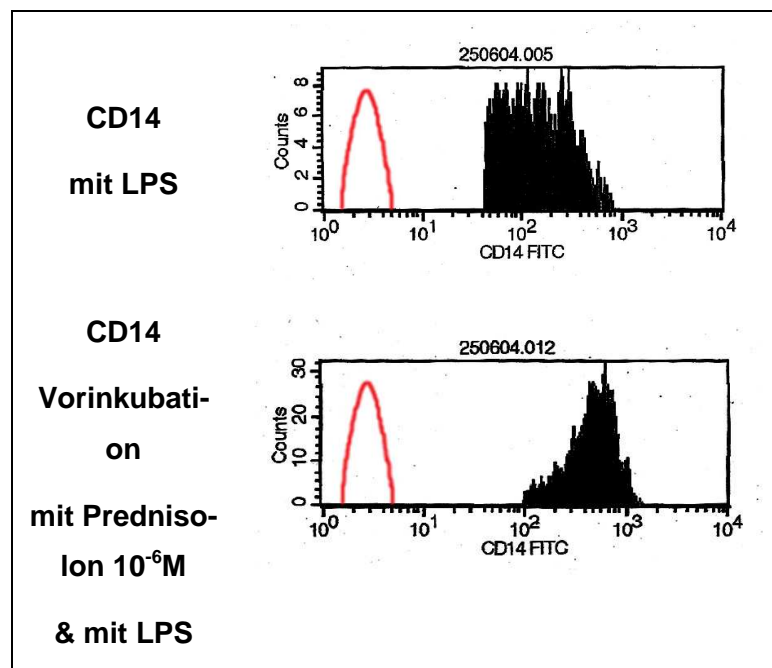


Abbildung 34: Prednisolon-induzierter Shift der monozytären CD14-Expression nach Prednisolon-Vorinkubation und späterer LPS-Exposition, Messzeitpunkt nach 72 Stunden, rote Linie: schematische Darstellung der Isotypkontrolle

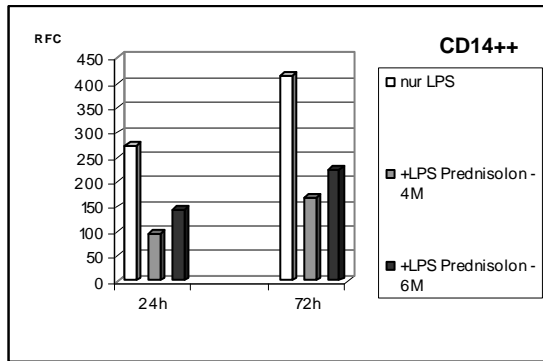


Abbildung 35: Dosisabhängige Expression von CD14++ bei mit LPS vorinkubierten Monozyten

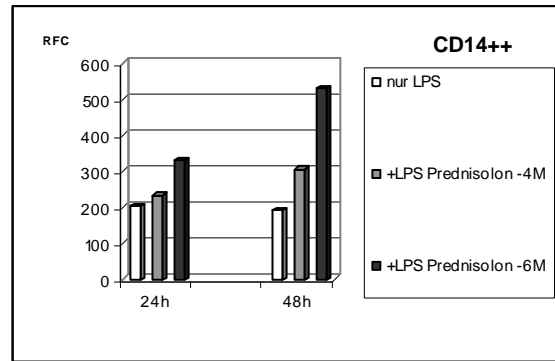


Abbildung 36: Dosisabhängige Expression von CD14++ bei Monozyten mit zeitlich späterer LPS-Exposition

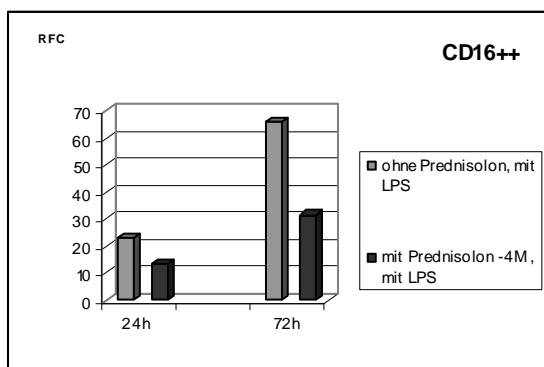


Abbildung 37: Expression von CD16++ bei mit LPS vorinkubierten Monozyten

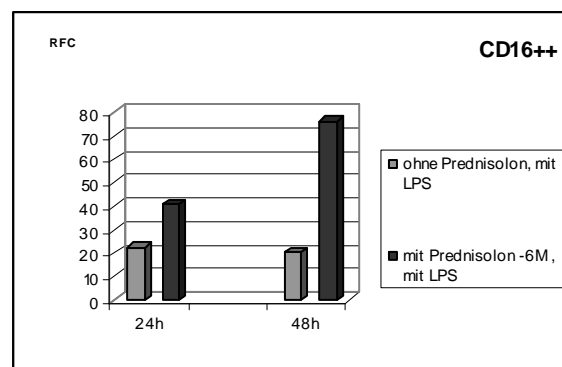


Abbildung 38: Expression von CD16++ bei Monozyten mit zeitlich späterer LPS-Exposition

Das folgende Scatter-Diagramm des Flowzytometers (Abbildung 39) verdeutlicht die Verteilung der CD14<sup>++</sup> Subpopulationen LPS stimulierter Monozyten unter dem Einfluss von Prednisolon: Eine Verschiebung der Zellwolke nach links kennzeichnet die durch Prednisolon verminderte Expression von CD14. Die gleichfalls verminderte Ausprägung des CD16<sup>+</sup> Subtyps durch Prednisolon war an der „gestauchten“ Zellwolke zu erkennen. Ebenso kann der zeitliche Verlauf der Rezeptorexpression am Scatter-Diagramm nachvollzogen werden: Zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden (rechte Seite der Abbildung) war im Gegensatz zum Messzeitpunkt nach 24 Stunden (linke Seite der Abbildung) die Zellwolke nach rechts (vermehrt CD14) und oben (vermehrt CD16) verschoben.

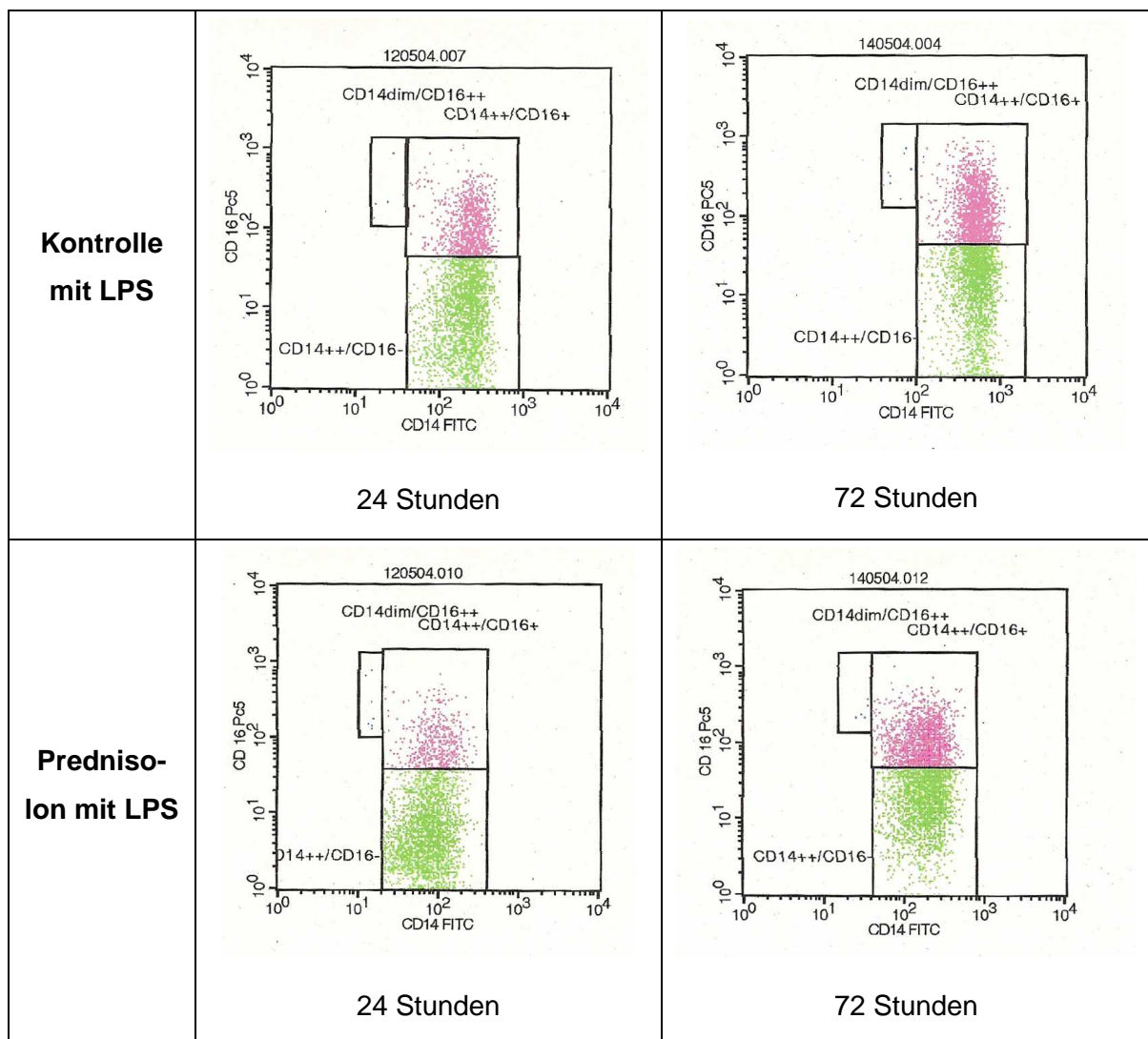


Abbildung 39: Scatter-Diagramm des Einflusses von Prednisolon auf die CD14<sup>++</sup> Subpopulation LPS stimulierter Monozyten in vitro.

## Prednisolon und die Expression von HLA-DR auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:

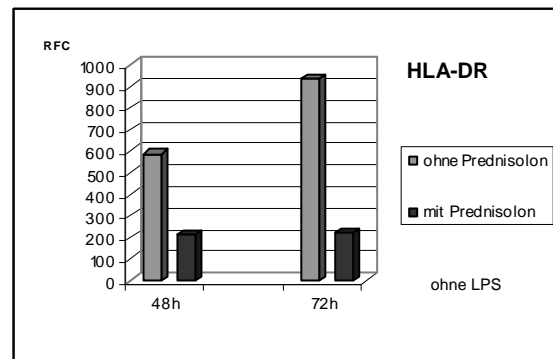
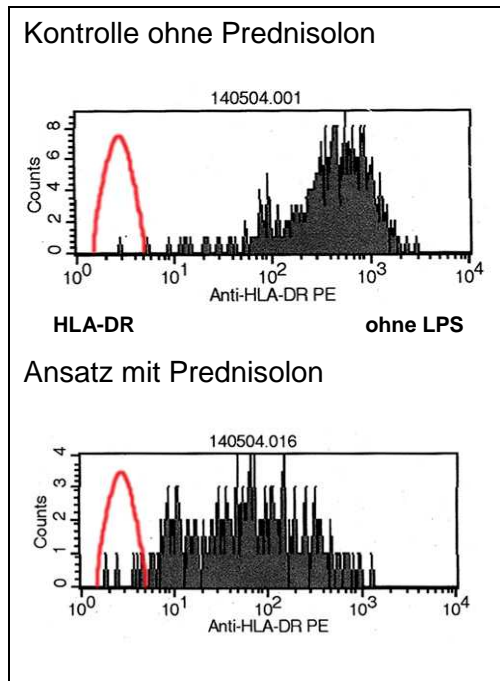


Abbildung 40: HLA-DR Expression unstimulierter CD14++ Monozyten unter Einfluss von Prednisolon

Abbildung 41: Prednisolon-induzierter Shift d.h. Abnahme der monozytären HLA-DR-Expression, rote Linie: schematische Darstellung der Isotypkontrolle

Durch Prednisolon wurde die HLA-DR Expression unstimulierter Monozyten vermindert, ausgeprägter in höherer Dosierung (Abbildungen 41-42). Wurden Monozyten mit LPS vorinkubiert, kam es zu einer geringfügigen Verminderung der Expression von HLA-DR. Der gleiche Effekt wurde beobachtet, wenn die LPS-Exposition erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte (Abbildungen 42-43). Die Unterschiede zwischen den Prednisolon-Dosierungen waren gering. Die Wirkung von LPS auf HLA-DR, d.h. dessen verminderte Expression, wurde durch Prednisolon verstärkt.

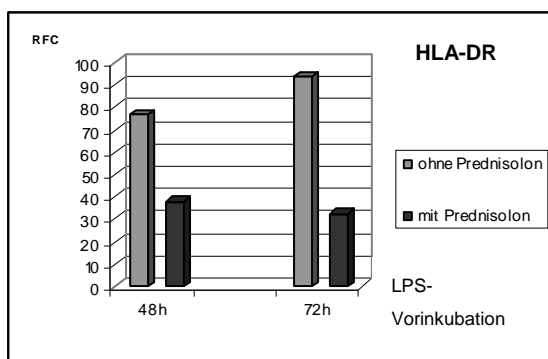


Abbildung 42: HLA-DR Expression mit LPS vorinkubierter CD14++ Monozyten unter Prednisolon ( $p < 0,001$ )

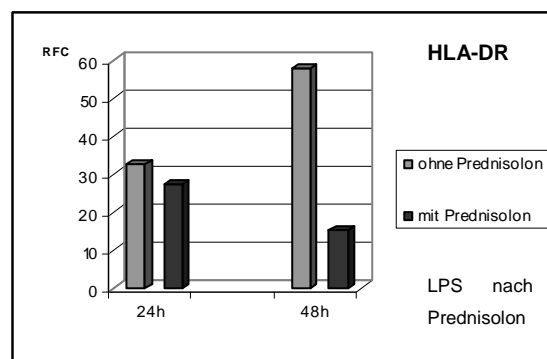


Abbildung 43: HLA-DR Expression CD14++ Monozyten unter Prednisolon nach zeitlich späterer LPS-Exposition ( $p < 0,001$ )

## Prednisolon und die Expression von TLR2 und TLR4 auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten

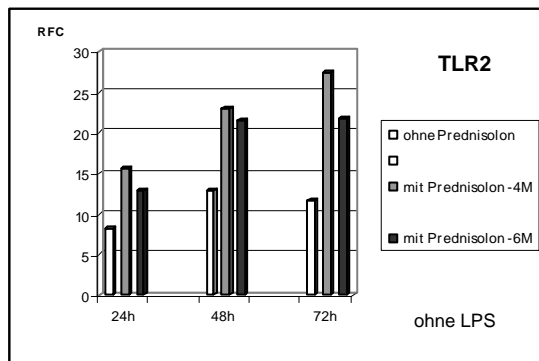


Abbildung 44: Dosisabhängige Expression von TLR2 CD14++ unstimulierter Monozyten unter Prednisolon ( $p < 0,01$ )

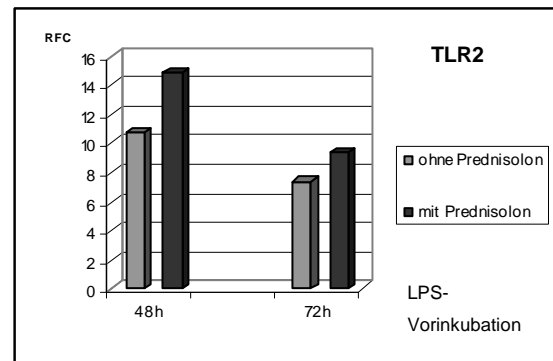


Abbildung 45: TLR2-Expression CD14++ Monozyten nach LPS-Stimulation unter Prednisolon

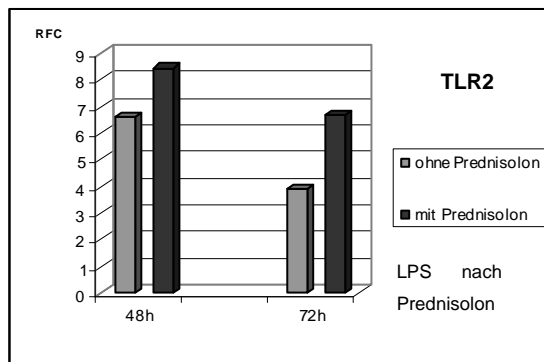


Abbildung 46: Effekt von Prednisolon: Zunahme der TLR2 Expression auf CD14++ Monozyten nach zeitlich verzögertem LPS-Kontakt

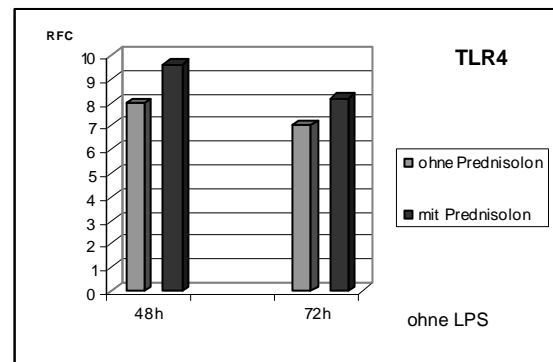


Abbildung 47: TLR4-Expression CD14++ unstimulierter Monozyten ( $p < 0,05$ )

Unter Prednisolon nahm bei unstimulierten Monozyten die TLR2 Expression zu, die unter höherer Glukokortikoid-Dosierung ausgeprägter war (Abbildung 44). Der gleiche Effekt, d.h. eine Erhöhung der TLR2-Expression, war bei stimulierten Monozyten zu beobachten. Dies galt sowohl für die Vorinkubation mit LPS als auch für einen zeitlich späteren LPS-Kontakt (Abbildungen 45-46).

Auch für TLR4 ergab sich durch Prednisolon auf unstimulierten Monozyten eine vermehrte Expression, die bei höherer Dosierung ausgeprägter war (Abbildung 47).

Wurden kultivierte Monozyten mit LPS vorinkubiert, nahm die Expression von TLR4 ab (Abbildung 48). Ein gegensätzlicher Effekt wurde beobachtet, wenn der LPS-Kontakt zu einem späterem Zeitpunkt erfolgte: Die Expression von TLR4 war jetzt erhöht. Diese Effekte waren jeweils in höherer Dosierung ausgeprägter.

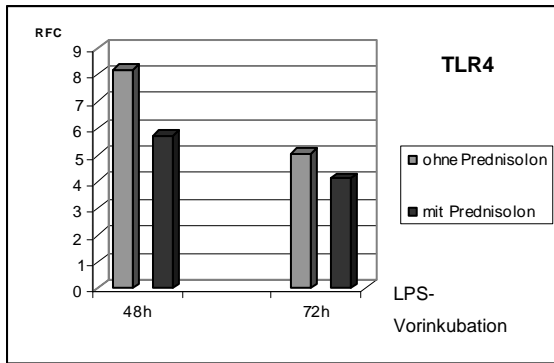


Abbildung 48: TLR4 Expression unter Prednisolon von CD14++ Monozyten nach LPS-Stimulation (bei 48h:  $p < 0,01$ )

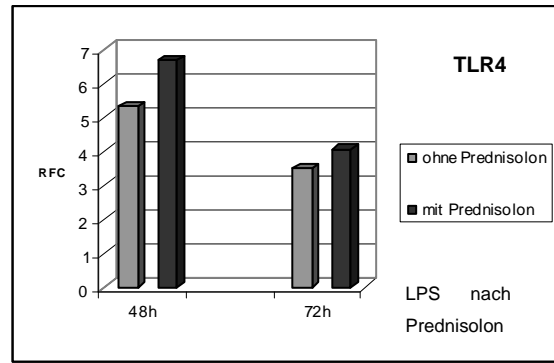


Abbildung 49: TLR4-Expression unter Prednisolon von CD14++ Monozyten nach zeitlich verzögerter LPS-Exposition.

## 4.2.4 Atorvastatin, LDL und e-LDL

### 4.2.4.1 Einfluss von Atorvastatin auf Monozytenantigene (in vitro)

Atorvastatin kam in den Dosierungen  $10^{-6}$  M/ml,  $10^{-8}$  M/ml und  $10^{-12}$  M/ml zum Einsatz.

Tabelle 9: Modulation der Expression monozytärer Antigene unter dem Einfluss von Atorvastatin

Statin	Versuch	Expression der Antigene (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)
CD14++	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt
	Atorvastatin mit unstimulierten Monozyten	vermindert, wenig ausgeprägt, meist erst zum Messzeitpunkt „48 Stunden“
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend
	Atorvastatin mit stimulierten Monozyten	nicht eindeutig
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend
CD16+	Stimulation der Monozyten mit LPS	gering vermehrt
	Atorvastatin mit unstimulierten Monozyten	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend
	Atorvastatin mit stimulierten Monozyten	nicht eindeutig
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend
HLA-DR	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert
	Atorvastatin mit unstimulierten Monozyten	erhöht

Statin	Versuch	Expression der Antigene (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	nicht eindeutig
	Atorvastatin mit stimulierten Monozyten	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	nicht eindeutig
TLR2	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert
	Atorvastatin mit unstimulierten Monozyten	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend
	Atorvastatin mit stimulierten Monozyten	erhöht
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend
TLR4	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert
	Atorvastatin mit unstimulierten Monozyten	nicht eindeutig
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend
	Atorvastatin mit stimulierten Monozyten	erhöht
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend

### Atorvastatin und die Expression von CD14 auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:

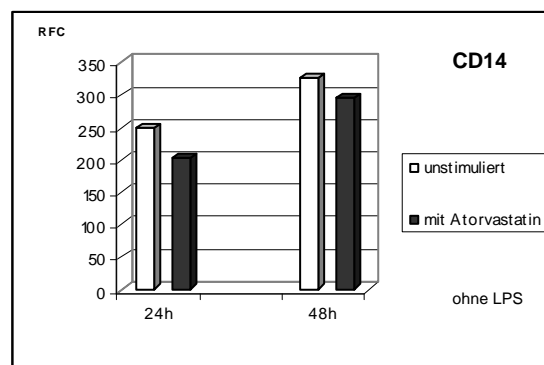


Abbildung 50: Einfluss von Atorvastatin auf CD14++ unstimulierter Monozyten, keine signifikante Änderung

Nach Inkubation der Zellen mit Atorvastatin verminderte sich geringfügig die Expression von CD14 (Abbildung 50). Die zusätzliche Gegenwart von LPS induzierte eine Erhöhung des membrangebundenen CD14 im Verlauf der Zellkultur. Durch Atorvastatin wurde jedoch CD14 in mit LPS vorinkubierten Monozyten nicht eindeutig beeinflusst.

## Effekt von Atorvastatin auf die Expression von CD16:

CD16 reagierte wie CD14 mit einer verminderten Expression unter Einfluss von Atorvastatin. Dieser Effekt lies sich nur bei unstimulierten Monozyten feststellen. Bei mit LPS stimulierten Monozyten war kein eindeutiger Effekt nachweisbar.

## Expression von HLA-DR auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:

Bei unstimulierten Monozyten stieg die Expression von HLA-DR während der Dauer der Zellkultur kontinuierlich an. Dieser Effekt blieb bei mit LPS stimulierten Zellen unverändert bestehen. Die Expression von HLA-DR wurde unter dem Einfluss von Atorvastatin vermehrt. Die ausgeprägte Hemmung der HLA-Expression durch LPS wird jedoch durch Atorvastatin verstärkt. Diese Effekte konnten am deutlichsten erst gegen Ende der Zellkulturzeit, d.h. beim Messzeitpunkt nach 48 Stunden, beobachtet werden (Abbildungen 51-52).

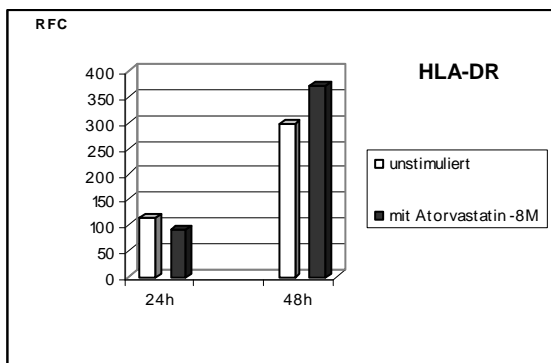


Abbildung 51: Expression von HLA-DR unstimulierter Monozyten unter dem Einfluss von Atorvastatin ( $p < 0,05$ )

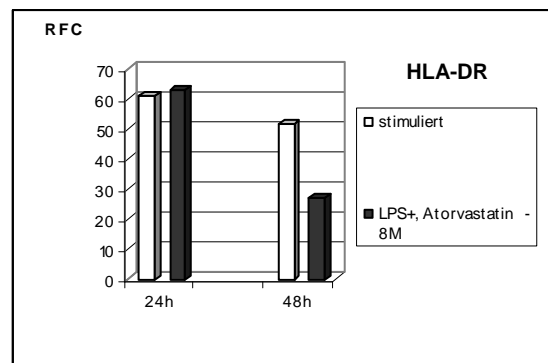


Abbildung 52: Expression von HLA-DR stimulierter Monozyten unter dem Einfluss von Atorvastatin ( $p < 0,01$ ). Der Skalenvorgleich zu Abbildung 52 zeigt die bereits dramatische Abregulation von HLA-DR unter LPS.

## Expression von TLR2 und TLR4 auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:

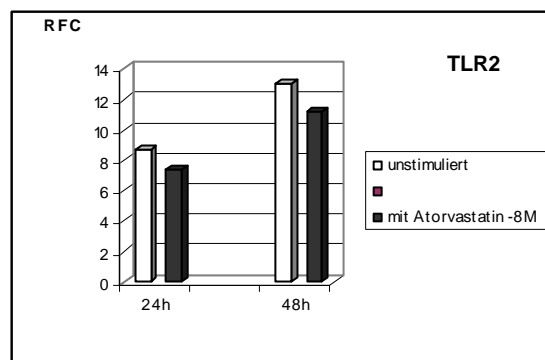


Abbildung 53: Effekt von Atorvastatin auf TLR2 unstimulierter Monozyten



Atorvastatin verminderte bei unstimulierten Monozyten nach 24 Stunden die Expression von TLR2 (Abbildung 53), während für den TLR4-Rezeptor kein eindeutiges Ergebnis für unstimulierte Monozyten dargestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu kam es bei LPS stimulierten Monozyten zu einer geringfügigen Erhöhung der Rezeptorexpression sowohl von TLR2 als auch von TLR4.

Die Befunde waren für uns abschließend nicht endgültig beurteilbar, da ein Einfluss der Trägersubstanz für die Lösung des Statins auf die Immunphänotypie der Zellen nicht auszuschließen war. Aus unseren Daten erhebt sich die Frage, ob dieser Aspekt bei anderen Studien berücksichtigt wurde oder ob mögliche Artefakte in die Schlussfolgerungen einzubeziehen sind.

#### 4.2.4.2 Einfluss von LDL und e-LDL auf Monozytenantigene (in vitro)

LDL und e-LDL wurde in der Dosierung 75 µg/ml eingesetzt.

Tabelle 10: Modulation der Expression monozytärer Antigene unter dem Einfluss von LDL und e-LDL

	Versuch, Monozyten ohne LPS	Expression der Antigene unter dem Einfluss von LDL	Expression der Antigene unter dem Einfluss von e-LDL
<b>CD14+</b>	Substanz	vermindert	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression	abfallend	abfallend
<b>CD16+</b>	Substanz	vermindert	vermindert
	zeitlicher Verlauf der Expression	abfallend	abfallend
<b>HLA-DR</b>	Substanz	vermehrt	steigend mit z.T. außergewöhnlich hohen Werten
	zeitlicher Verlauf der Expression	steigend	steigend
<b>TLR2</b>	Substanz	vermindert	vermehrt
	zeitlicher Verlauf der Expression	steigend	steigend
<b>TLR4 extra</b>	Substanz	vermehrt	vermehrt
	zeitlicher Verlauf der Expression	steigend	steigend
<b>TLR4 intra</b>	Substanz	vermindert (2 von 3)	vermindert (2 von 3)
	zeitlicher Verlauf der Expression	steigend	steigend (2 von 3)

## Expression von CD14 und CD16 auf unstimulierten Monozyten:

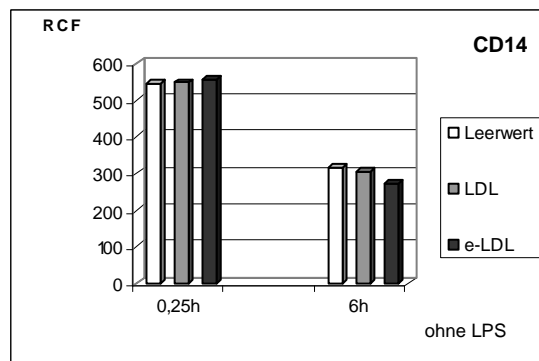


Abbildung 54: Expression von CD14++ kultivierter Blutmonozyten unter dem Einfluss von LDL und e-LDL

Sowohl bei CD14 (Abbildung 54) als auch CD16 wurde nach dem Kontakt mit LDL und e-LDL eine verminderte Expression festgestellt. Bei den sehr früh gemessenen Zeitintervallen von 6 und 12 Stunden verminderte sich auch bei den Kontrollwerten ohne Lipid sowohl die CD14+ als auch die CD16+ Expression.

## HLA-DR Expression unstimulierter Monozyten unter LDL und e-LDL:

Unter dem Einfluss der Lipoproteine LDL und vor allem e-LDL zeigte HLA-DR tendenziell eine Erhöhung der Expression gegen Ende der Kulturzeit. Die Veränderungen waren bei Kontakt mit e-LDL deutlicher als mit LDL (Abbildung 55).

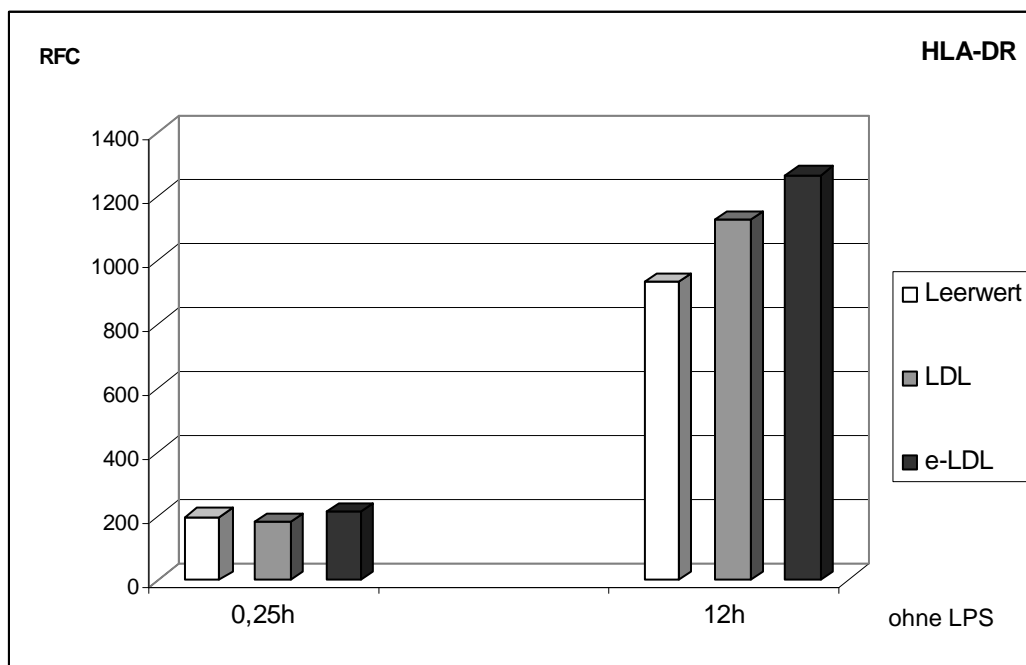


Abbildung 55: Monozytäre Expression von HLA-DR unter dem Einfluss von LDL und e-LDL

### Expression von TLR2 auf unstimulierten Monozyten:

Der TLR2-Rezeptor zeigte nach dem Kontakt mit LDL in Mehrfachansätzen tendenziell eine verminderte Expression. Das enzymatisch modifizierte Lipoprotein (e-LDL) erhöhte dagegen die TLR2-Expression.

Bei einem Spender (männlich, 30 Jahre) reagierte der Toll-like Rezeptor 2 nach sechs Stunden unerwartet mit einer extremen Erhöhung auf dem Kontakt mit e-LDL (Abbildung 56-57).

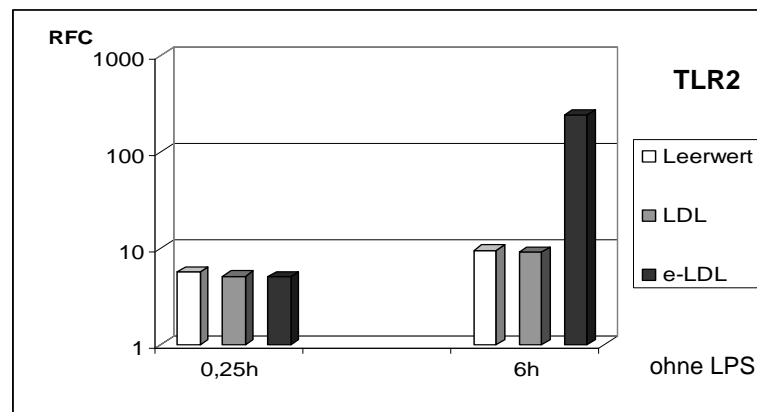


Abbildung 56 Starke Erhöhung der Expression von TLR2 kultivierter peripherer Blutmonozyten nach Inkubation mit enzymatisch modifizierten LDL (e-LDL), logarithmische Darstellung

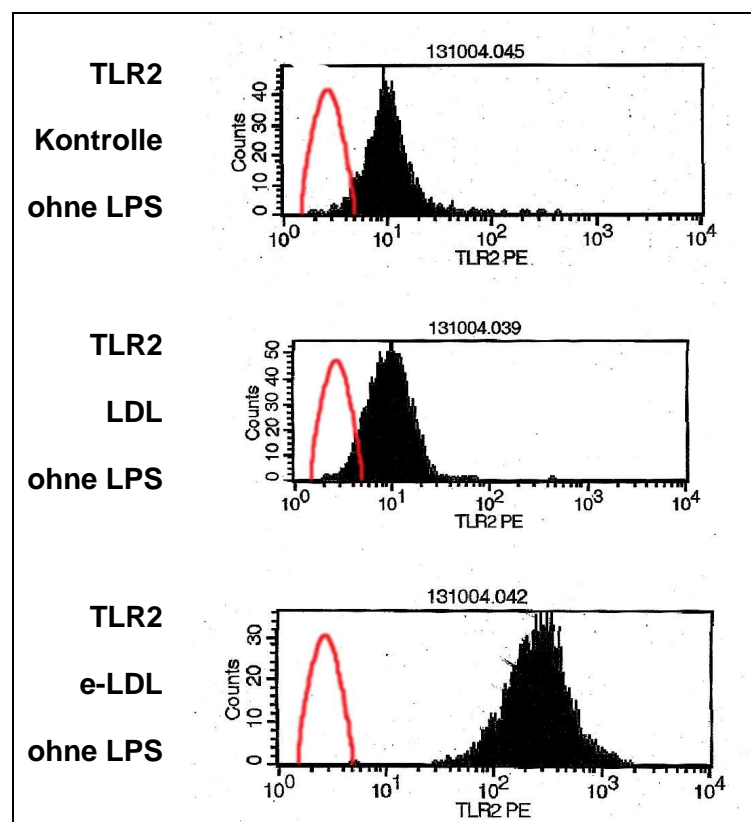


Abbildung 57: Stark ausgeprägte Reaktion des TLR2-Rezeptors auf Inkubation mit e-LDL nach sechs Stunden Kulturzeit peripherer Blutmonozyten. Der Spender war männlich und 30 Jahre alt. In der Untersuchungsserie hat TLR2 und TLR4 Spender-individuell auf e-LDL reagiert. Rote Linie: schematische Darstellung der Isotypkontrolle

### Expression von TLR4 „extra“ und TLR4 „intra“ auf unstimulierten Monozyten:

Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bestimmung des extrazellulären Toll-like Rezeptors 4 ergab sich keine eindeutige Veränderung der Expression nach dem Kontakt sowohl mit LDL als auch mit e-LDL (Abbildung 58). Wie bei TLR2 reagierte jedoch bei einem Spender auch der Toll-like Rezeptor 4 nach sechs Stunden mit einer sehr starken Erhöhung auf den Kontakt mit e-LDL. Auch hier zeigen sich mögliche interindividuelle Unterschiede in der Suszeptibilität und Reaktivität antigenpräsentierender Zellen.

Die Expression des intrazellulären TLR4 zeigte eine Tendenz zur Verminderung der Expression nach Kontakt mit den Lipoproteinen (Abbildung 58).

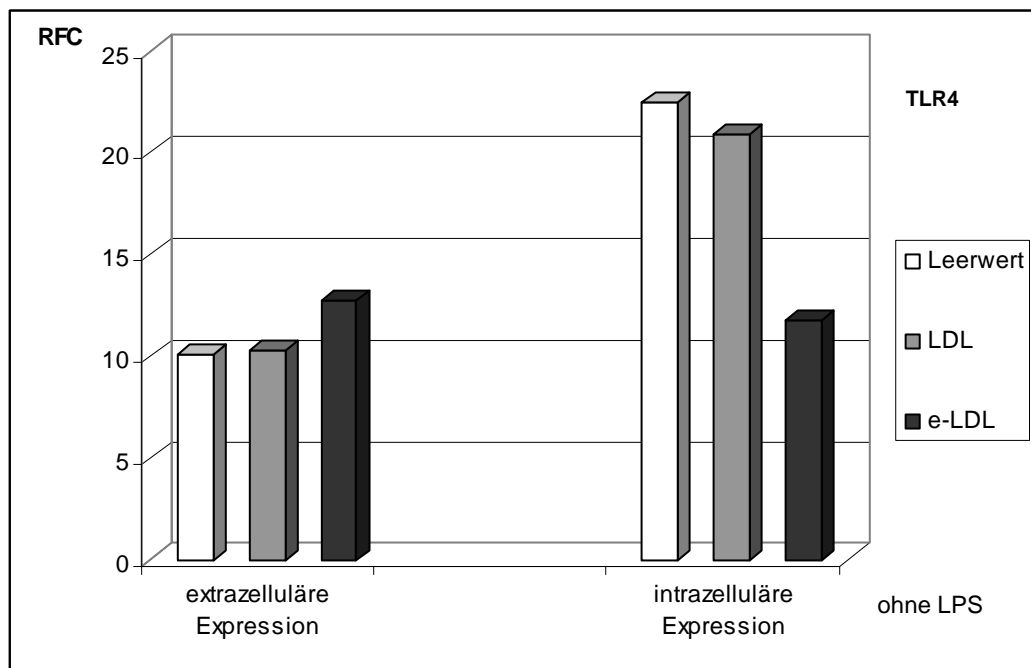


Abbildung 58: Extra- und intrazelluläre Expression von TLR4 kultivierter Blutmonozyten Gesunder unter dem Einfluss der Lipoproteine LDL und e-LDL, RFC= relative fluorescence channel.

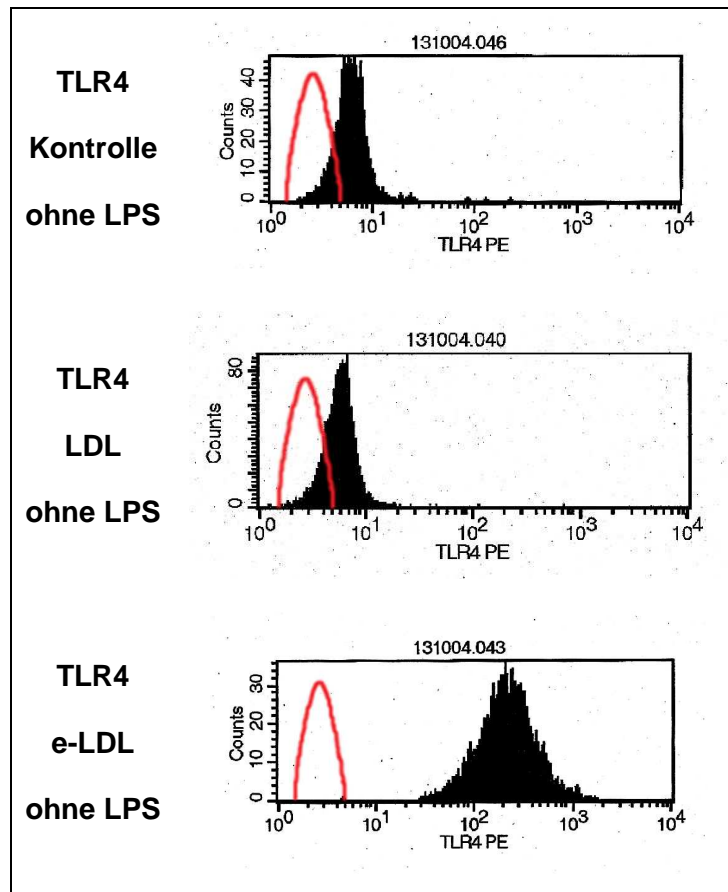


Abbildung 59: Ausgeprägte Hochregulation des extrazellulären monozytären TLR4-Rezeptors nach Inkubation mit enzymatisch modifizierten LDL (e-LDL), FACS-Messung nach sechs Stunden Kulturzeit. Der Spender war männlich und 30 Jahre alt. In der Untersuchungsserie hat TLR2 und TLR4 allein dieses Spenders derart auf e-LDL reagiert. Rote Linie: schematische Darstellung der Isotypkontrolle

#### 4.2.4.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Monozyten wurden mit LDL und e-LDL inkubiert und nach 15 Minuten sowie nach sechs Stunden für die Elektronenmikroskopie (EM 10 CR der Fa. Zeiss) nach Standardprotokoll aufbereitet und fixiert. Bei gleichem Laborprotokoll unterschieden sich die kultivierten Zellen der verschiedenen Spender in ihrem morphologischen Erscheinungsbild:

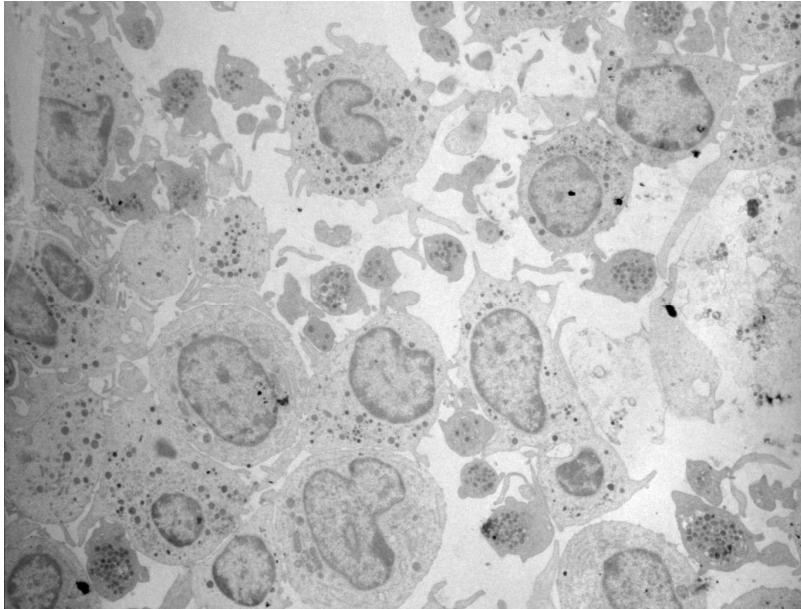


Abbildung 60: Kultivierte Monozyten, Spender A, männlich, 30 Jahre, Transmissionselektronenmikroskopie Vergr. x ca. 1200

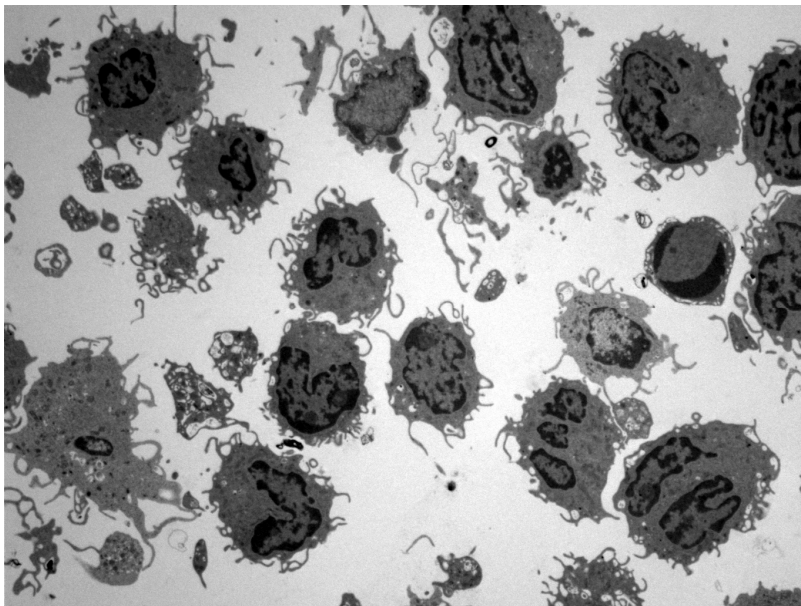


Abbildung 61: Kultivierte Monozyten, Spender B, männlich, 35 Jahre, Transmissionselektronenmikroskopie Vergr. x ca. 1200

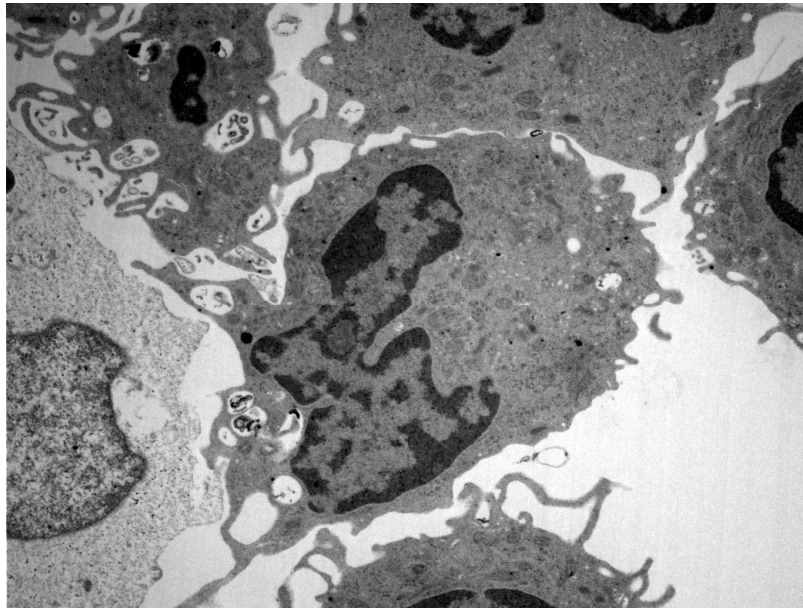


Abbildung 62: Kultivierter Monozyt, Transmissionselektronenmikroskopie Vergr. ca. 6000

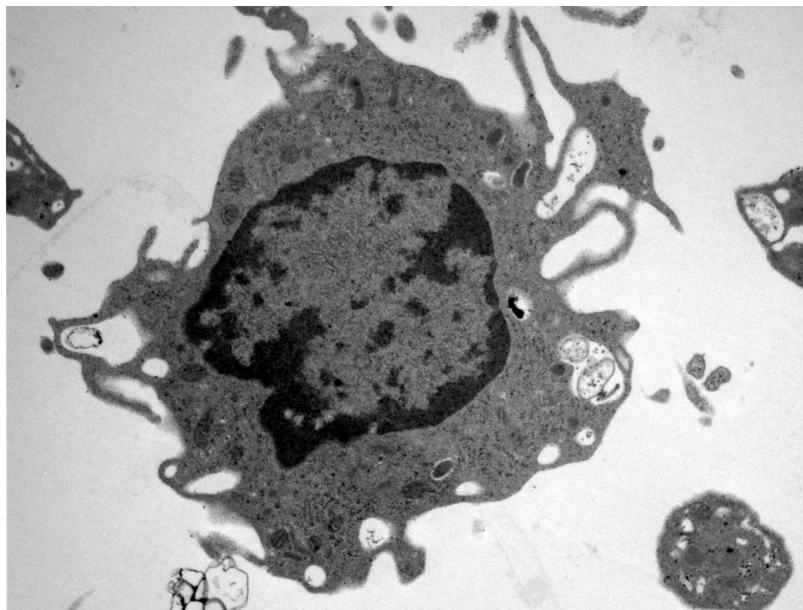


Abbildung 63: Kultivierter Monozyt, Transmissionselektronenmikroskopie Vergr. x ca. 6000

Diese Aufnahmen aus der Transmissionselektronenmikroskopie zeigen repräsentativ einzelne Monozyten aus der Zellkultur.

Abbildung 62 und 63: Die Monozyten des Kontrollansatzes (Abbildung 62) ähneln im Erscheinungsbild den mit LDL inkubierten Zellen (Abbildung 63). Nach sechs Stunden Inkubationszeit ließen sich keine Lipideinschlüsse nachweisen. Wenige unspezifische dunkle Einschlüsse beruhen möglicherweise auf einer Kontamination (Staub) aus der Umgebung während der Aufbereitung.

Bei Monozyten, die mit enzymatisch verändertem Lipoprotein (e-LDL) inkubiert wurden, waren bereits nach 15 Minuten phagozytierte Fetttröpfchen zu sehen (Abbildungen 64-66).

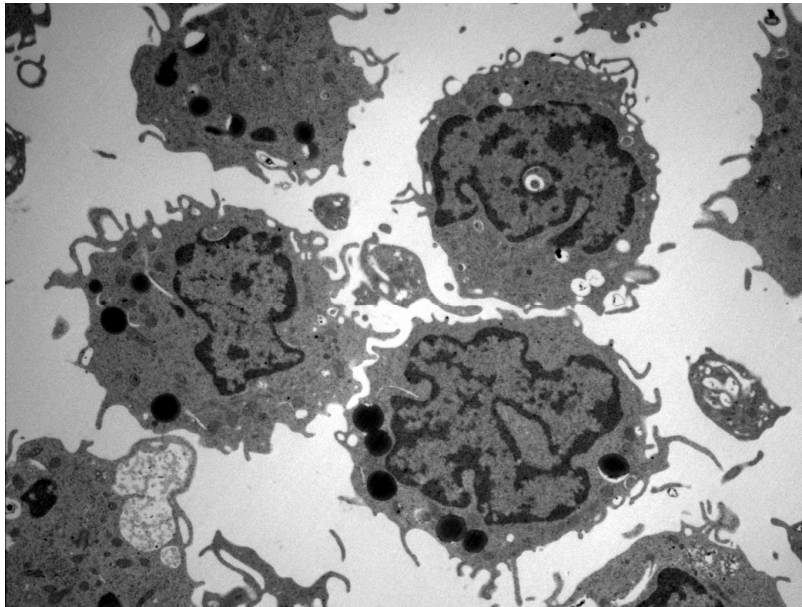


Abbildung 64: Monozyten nach Inkubation mit e-LDL nach 15 Minuten: deutliche Lipideinschlüsse im Zytoplasma, Transmissionselektronenmikroskopie Vergr. ca. 5000

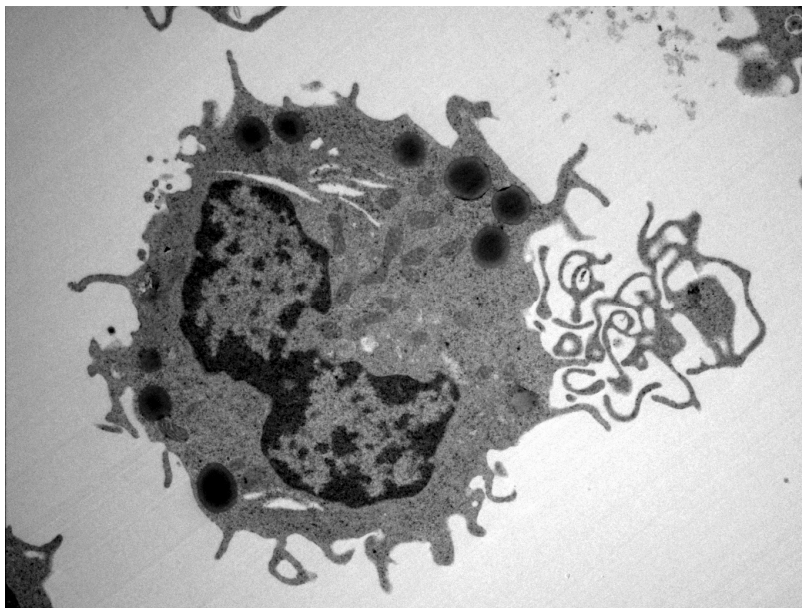


Abbildung 65: Monozyt nach Inkubation mit e-LDL nach sechs Stunden: deutliche Lipideinschlüsse im Zytoplasma, Transmissionselektronenmikroskopie, Vergr. ca. 5000



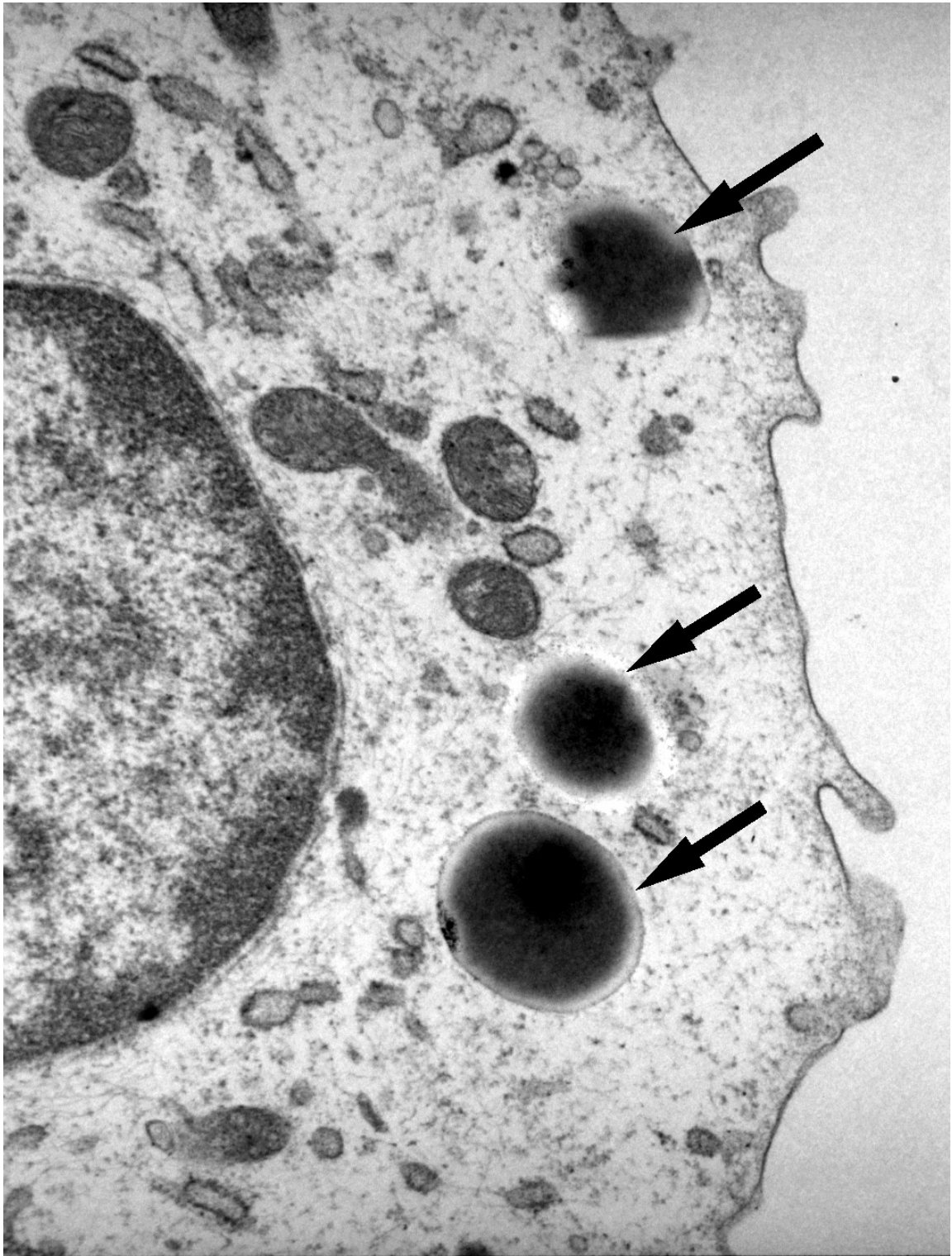


Abbildung 66: Mit e-LDL inkubierter Monozyt nach sechs Stunden: Lipideinschlüsse im Zytoplasma, Transmissionselektronenmikroskopie Vergrößerung x ca. 40.000

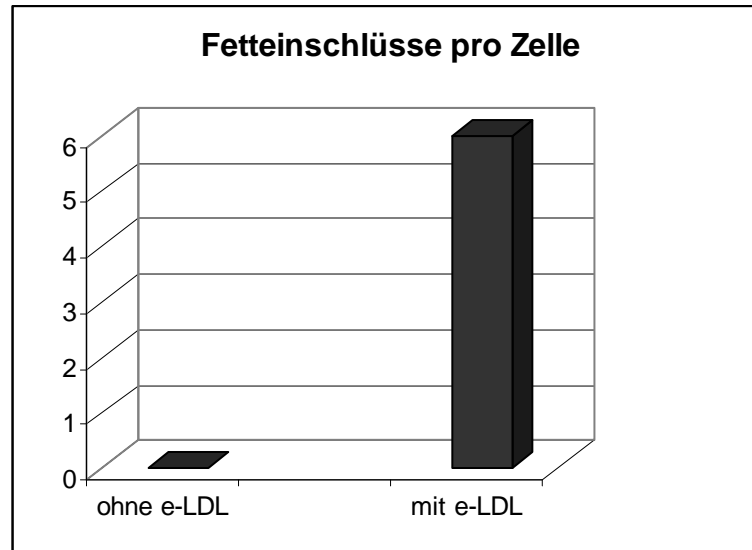


Abbildung 67: Nach sechs Stunden Inkubationszeit fanden sich in Monozyten (n=10) im Durchschnitt sechs Fetteinschlüsse pro Zelle

#### 4.2.4.4 Einfluss von Atorvastatin mit LDL und e-LDL auf Monozytenantigene (in vitro)

Tabelle 11: Modulation der Expression monozytärer Antigene unter dem Einfluss von Atorvastatin mit Lipoprotein

Atorvastatin	Versuch, Monozyten ohne LPS	Expression der Antigene unter dem Einfluss von LDL	Expression der Antigene unter dem Einfluss von e-LDL
Atorvastatin mit Lipoprotein auf unstimulierten	CD14	vermindert	vermindert,
	CD16	vermindert	vermindert
	HLA-DR	vermindert	vermindert
	TLR2	vermindert	vermindert
	TLR4	vermindert	vermindert

Die Befunde waren für uns abschließend nicht endgültig beurteilbar, da ein Einfluss der Trägersubstanz für die Lösung des Statins auf die Immunphänotypie der Zellen nicht auszuschließen war.

#### 4.2.5 Vitamin D - Derivate: 1-alpha-Calcidol und Calcitriol

##### Einfluss von 1-alpha-Calcidol und Calcitriol (1-25-OH<sub>2</sub>-Vit-D) auf Monozytenantigene (in vitro)

1-alpha-Calcidol und Calcitriol kamen in den Dosierungen  $10^{-7}$  M/ml,  $10^{-9}$  M/ml und  $10^{-11}$  M/ml zum Einsatz.

Tabelle 12: Modulation der Expression monozytärer Antigene unter dem Einfluss der Vitamin D - Derivate 1-alpha-Calcidol und Calcitriol

Vit D - Derivate	Versuch	Expression der Antigene unter dem Einfluss von 1-alpha-Calcidol (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)	Expression der Antigene unter dem Einfluss von Calcitriol (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)
<b>CD14++</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt	vermehrt
	Vitamin D-Derivate mit unstimulierten Monozyten	vermehrt, ausgeprägter in höherer Dosierung	vermehrt, ausgeprägter in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend	steigend
	Vitamin -Derivate mit stimulierten Monozyten	vermehrt, ausgeprägter in höherer Dosierung	vermehrt, ausgeprägter in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend	steigend, zum Messpunkt „72 Stunden“ hin wieder abfallend
<b>CD 16+</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt	vermehrt
	Vitamin D-Derivate mit unstimulierten Monozyten	deutlich vermehrt in höherer Dosierung, vermindert in geringer Dosierung	vermehrt, deutlicher in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend	steigend, zum Messzeitpunkt „72 Stunden“ wieder abfallend oder stagnierend
	Vitamin D-Derivate mit stimulierten Monozyten	deutlich vermehrt in höherer Dosierung, vermindert oder gleich bleibend in geringerer Dosierung	vermehrt, deutlicher in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	steigend	steigend, zum Messzeitpunkt „72 Stunden“ wieder abfallend oder stagnierend
<b>HLA-DR</b>	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert	vermindert
	Vitamin D-Derivate mit unstimulierten Monozyten	vermindert, ausgeprägter in höherer Dosierung	vermindert, ausgeprägter in höherer Dosierung

Vit D - Derivate	Versuch	Expression der Antigene unter dem Einfluss von 1-alpha-Calcidol (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)	Expression der Antigene unter dem Einfluss von Calcitriol (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	mit 1-alpha-Calcidol sinkend / ohne 1-alpha-Calcidol I steigend	mit Calcitriol abfallend / ohne Calcitriol steigend
	Vitamin D-Derivate mit stimulierten Monozyten	vermindert, geringer Einfluss der Dosierung auf die durch LPS schon stark nach unten regulierte Expression	vermindert, ausgeprägter in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	abfallend	mit Calcitriol abfallend / ohne Calcitriol steigend
TLR2	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert	vermindert
	Vitamin D-Derivate mit unstimulierten Monozyten	vermindert, ausgeprägter in höherer Dosierung	vermindert, ausgeprägter in höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	mit 1-alpha-Calcidol abfallend / ohne 1-alpha-Calcidol steigend	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“ / danach abfallend
	Vitamin D-Derivate mit stimulierten Monozyten	vermindert, teilweise deutlichere Verminderung bei niedrigerer Dosierung	gering vermindert, geringe Unterschiede zwischen den Dosierungen
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“ / danach abfallend	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“ / danach abfallend
TLR4	Stimulation der Monozyten mit LPS	steigend	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“ / danach abfallend
	Vitamin D-Derivate mit unstimulierten Monozyten	vermindert	vermehrt zum Messpunkt „48 Stunden“ und in höherer Dosierung / anschließend vermindert, Ergebnis nicht bei allen Versuchen reproduzierbar
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“ / danach abfallend	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“ / danach abfallend
	Vitamin D-Derivate mit stimulierten Monozyten	vermehrt, nur in höherer Dosierung	vermehrt, geringe Unterschiede zwischen den Dosierungen

Vit D - Derivate	Versuch	Expression der Antigene unter dem Einfluss von 1-alpha-Calcidol (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)	Expression der Antigene unter dem Einfluss von Calcitriol (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend

### 1-alpha-Calcidol, Calcitriol und die Expression von CD14 auf unstimulierten und auf mit LPS aktivierten Monozyten:

Die monozytäre Expression von CD14 sowie von CD16 erhöhte sich langsam aber stetig im Verlauf der Zellkultur. Durch die Inkubation der Zellen mit 1-alpha-Calcidol und Calcitriol verstärkte sich dosisabhängig diese Expressionszunahme von CD14. LPS selbst induzierte eine Erhöhung des membrangebundenen CD14. Durch 1-alpha-Calcidol und Calcitriol wurde CD14 in mit LPS vorinkubierten Monozyten weiter nach oben reguliert. Vitamin D verstärkte zusammen mit LPS synergistisch die CD14 Expression (Abbildungen 68-71).

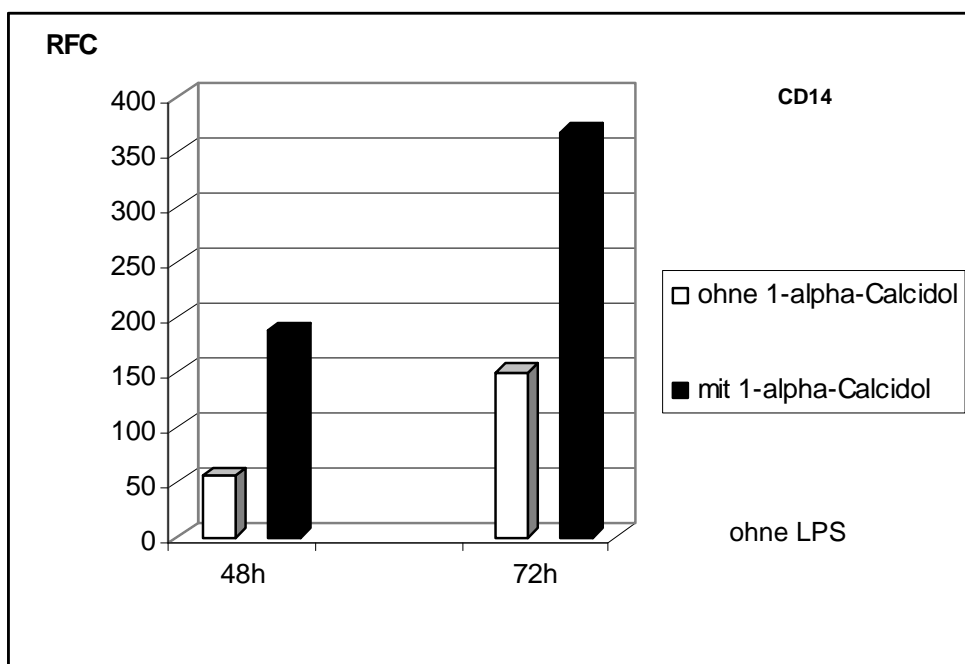


Abbildung 68: Zunahme der CD14 Expression unstimulierter Monozyten unter 1-alpha-Calcidol ( $p < 0,01$ )

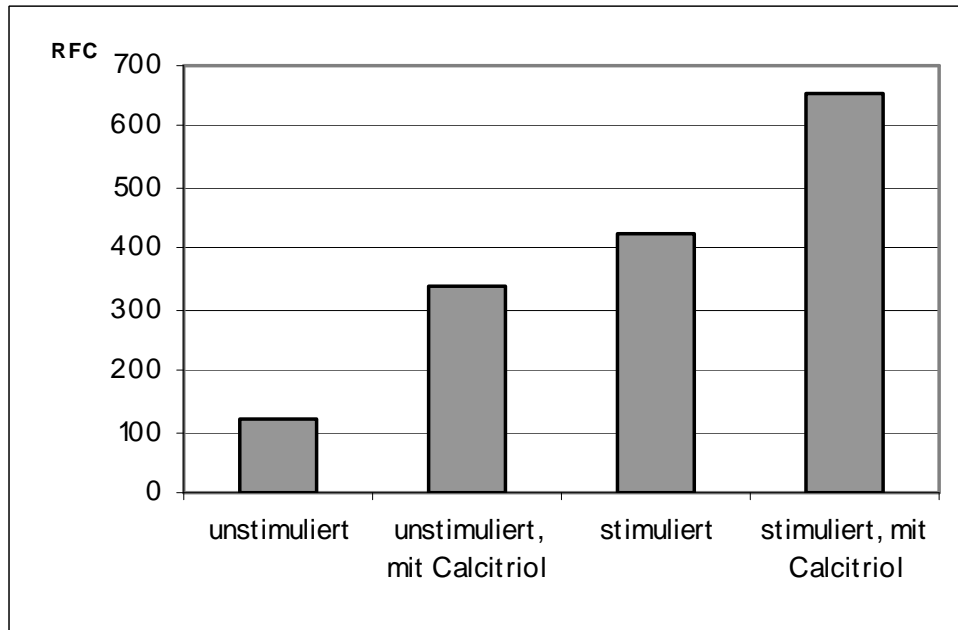


Abbildung 69: Vergleich der Expression von CD14 unstimulierter Monozyten und mit LPS stimulierter Monozyten unter Calcitriol

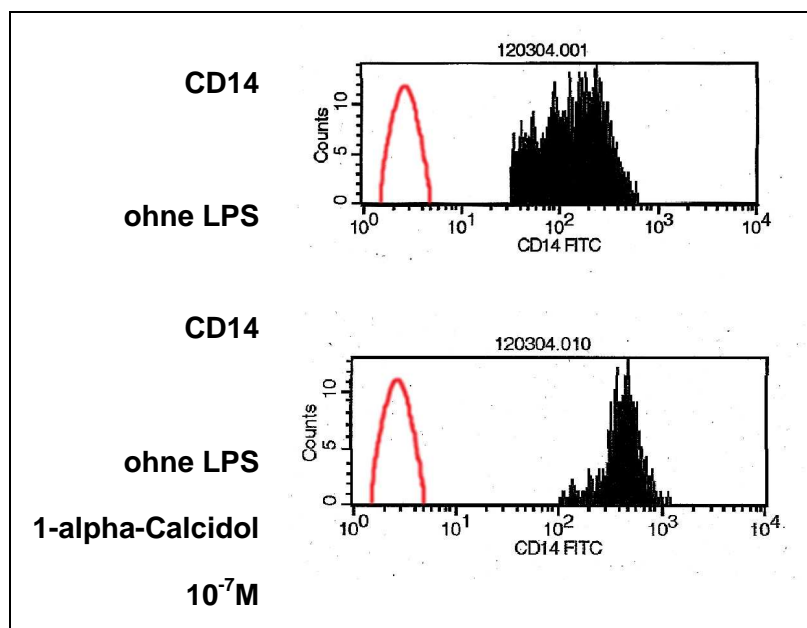


Abbildung 70: 1-alpha-Calcidol-induzierter Shift CD14 unstimulierter Monozyten zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden, rote Linie: schematische Darstellung der Isotypkontrolle

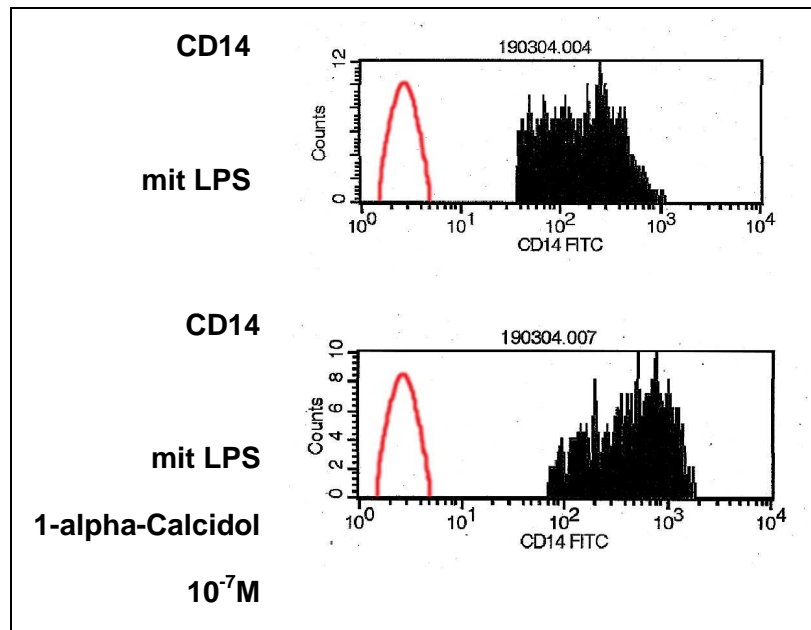


Abbildung 71: 1-alpha-Calcidol-induzierter Shift der CD14 Expression nach rechts (höhere Expression) zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden bei stimulierten Monozyten, rote Linie: schematische Darstellung der Isotyp-kontrolle

### Effekt von 1-alpha-Calcidol und Calcitriol auf die CD16+ Expression:

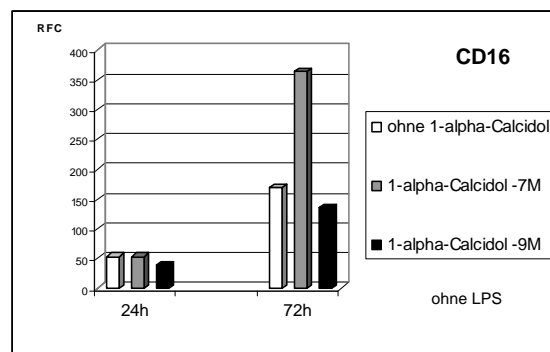


Abbildung 72: CD16+ Expression unstimulierter Monozyten

Sowohl bei unstimulierten als auch bei mit LPS stimulierten Monozyten kam es in der höheren Dosierung von 1-alpha-Calcidol ( $10^{-7}\text{M}$ ) ebenso wie bei Calcitriol zu einem deutlichen Anstieg der Expression von CD16. In der niedrigeren 1-alpha-Calcidol-Dosierung  $10^{-9}\text{M}$  dagegen fiel die Expression des Fc-Rezeptormoleküls leicht ab, bei Calcitriol lagen die Werte höher als die der Kontrollmessungen (Abbildung 72).

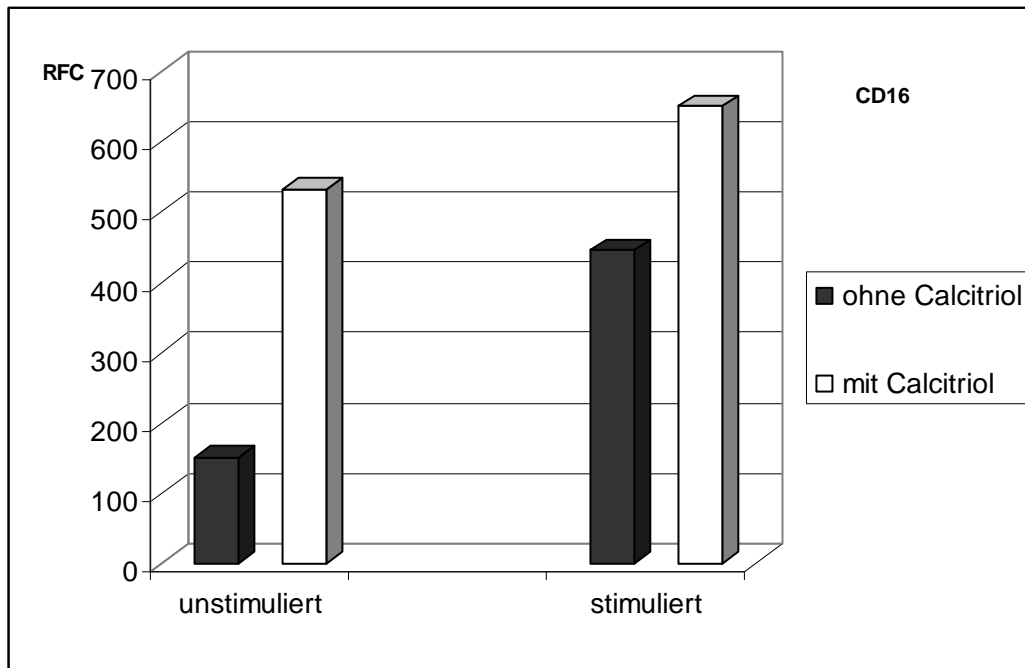


Abbildung 73: Expression des niedrig affinen Fc-gamma-III-Rezeptors CD16+ bei unstimulierten und LPS stimulierten Monozyten zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden unter Einfluss von Calcitriol ( $p < 0,01$ )

### Effekt von 1-alpha-Calcidol und Calcitriol (1-25-OH<sub>2</sub>-Vit-D) auf die HLA-DR-Expression:

Die Expression von HLA-DR wurde durch eine hohe, aber physiologische Dosierung ( $10^{-7}$  M) von 1-alpha-Calcidol dramatisch vermindert. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde schon nach 24 Stunden beobachtet ( $p = 0,04$ ), der noch deutlicher nach der Kulturzeit von 48 ( $p < 0,01$ ) und 72 Stunden ( $p < 0,0001$ ) wurde. Eine Verminderung der Expression ließ sich auch für Calcitriol nachweisen. Die potente Hemmung der HLA-Expression durch LPS wird durch 1-alpha-Calcidol und auch durch Calcitriol zusätzlich beeinflusst. Es kommt zu einer zusätzlich verstärkten Verminderung der Expression (Abbildungen 74-78).



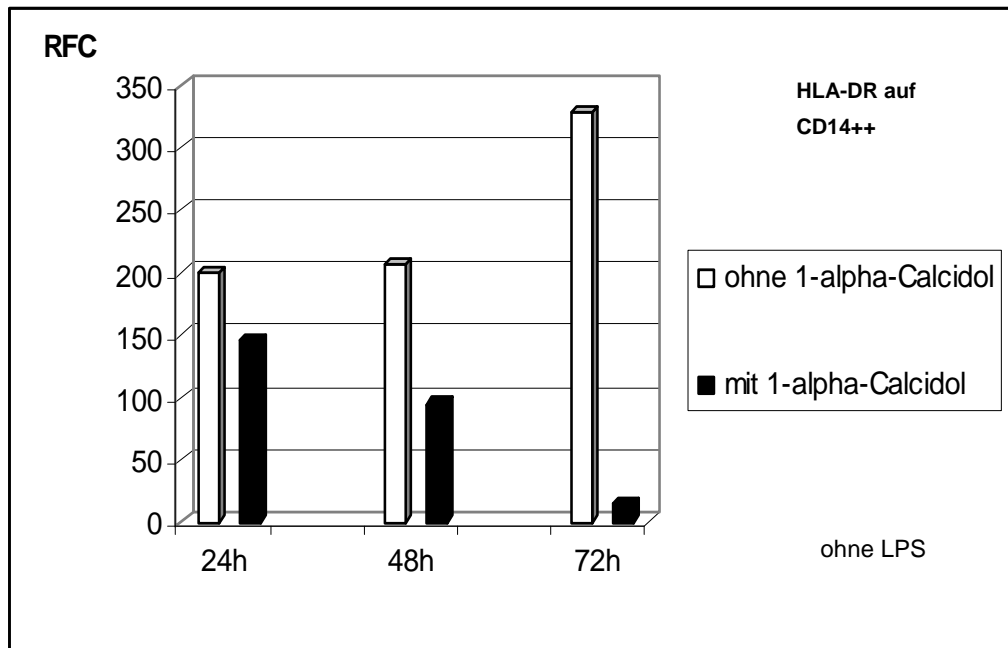


Abbildung 74: Abnahme der HLA-DR-Expression unter 1-alpha-Calciol bei unstimulierten CD14++CD16- Monozyten in Kultur ( $p < 0,0001$ )

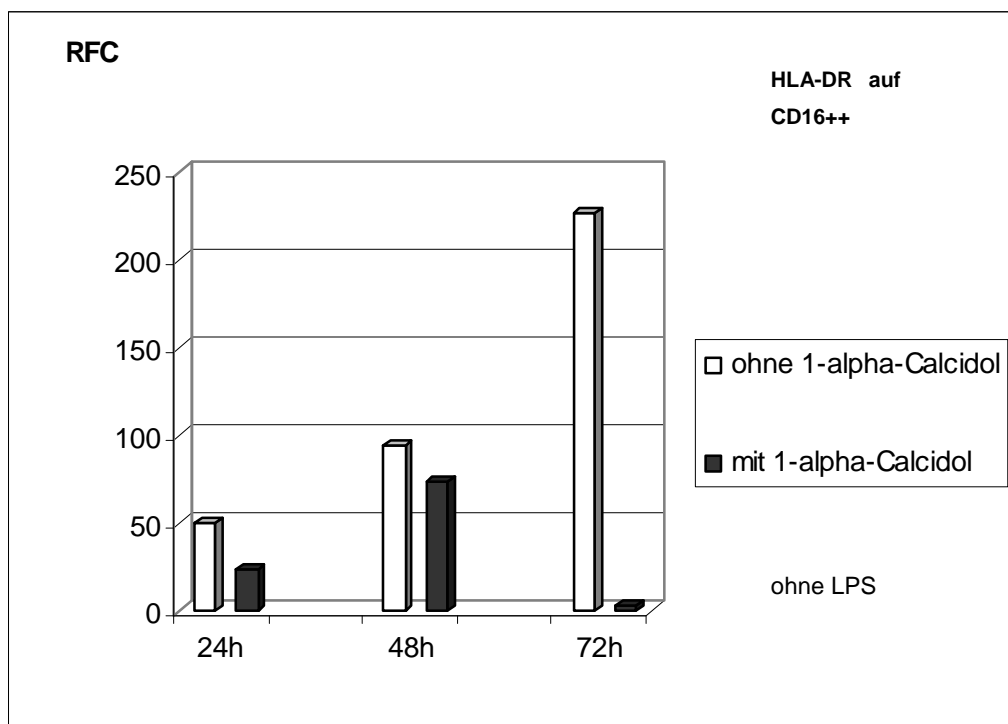


Abbildung 75: Abnahme der HLA-DR-Expression unter 1-alpha-Calciol bei unstimulierten CD16++ Monozyten in Kultur ( $p < 0,0001$ )

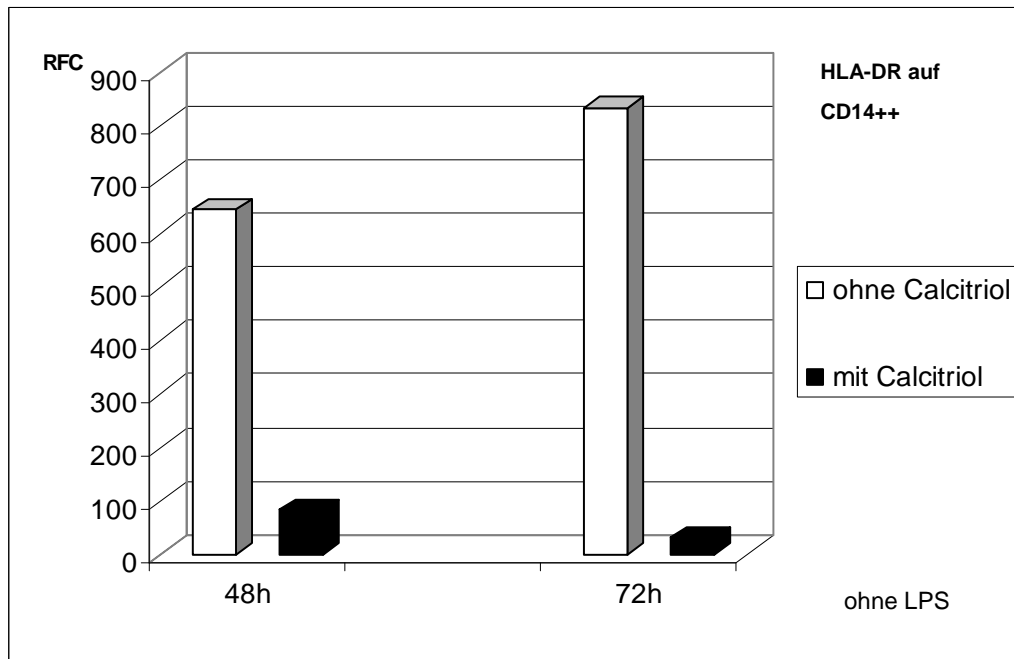


Abbildung 76: Abnahme der HLA-DR-Expression auf CD14++CD16- unstimulierten Monozyten durch das Vitamin D - Derivat 1-25-OH<sub>2</sub>-Vit-D. = Calcitriol ( $p < 0,0001$ )

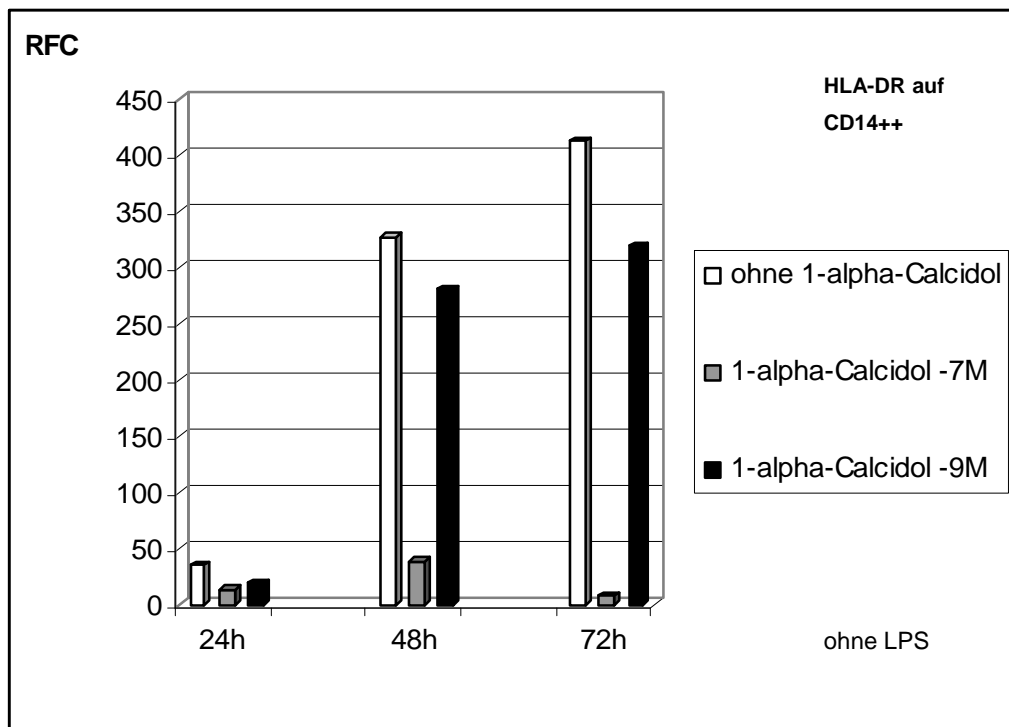


Abbildung 77: Das Vit D - Derivat 1-alpha-Calcidol supprimiert die HLA-DR-Expression dosisabhängig auf der CD14++CD16- Subpopulation unstimulierter kultivierter Blutmonozyten

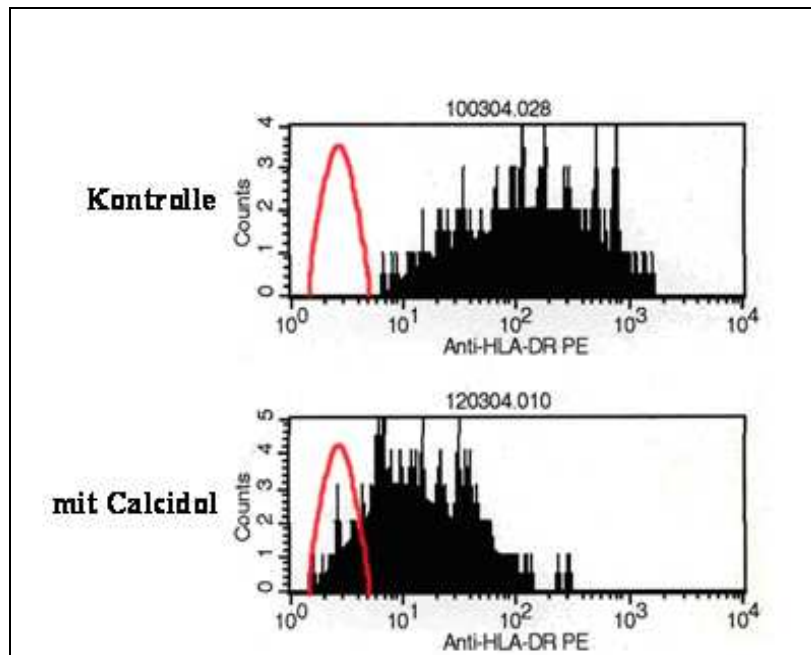


Abbildung 78: 1-alpha-Calcidol-induzierter Antigenshift der monozytären HLA-DR-Expression unstimulierter Monozyten

### Effekt von 1-alpha-Calcidol und Calcitriol auf die TLR2- und TLR4 – Expression:

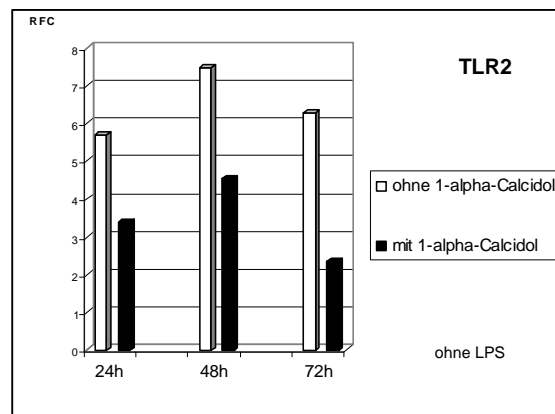


Abbildung 79: Expression von TLR2 auf CD14++CD16- unstimulierter Monozyten ( $p < 0,01$ )

Die unstimulierte monozytäre Expression von TLR2 verminderte sich unter dem Einfluss von Alphacalcidol der Dosierung  $10^{-7}$  M (Abbildung 79).

Auch durch Calcitriol kam es bei der Expression von TLR2 auf unstimulierten Zellen zu einer deutlichen und dosisabhängigen Verminderung. Bei LPS vorbehandelten Monozyten war der hemmende Effekt auf TLR2 sowohl durch 1-alpha-Calcidol als auch durch Calcitriol weniger ausgeprägt. Dieser geringe Effekt bei stimulierten Zellen wurde auch durch Unterschiede in der Dosierung kaum beeinträchtigt. Somit verhinderte Endotoxin die Interaktion von Vitamin D - Derivaten und TLR2-Expression.

Sowohl die niedrige als auch die höhere Dosierung von 1-alpha-Calciol verminderte die Expression von TLR4 bei unstimulierten Zellen. Bei stimulierten Zellen kam es nur bei höherer Dosierung zu einer vermehrten TLR4-Expression. Die Expression von TLR4 unter Calciol auf unstimulierten Monozyten war zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden vermindert. Monozyten, die mit LPS vorinkubiert wurden, zeigten unter dem Einfluss von Calciol eine vermehrte Expression von TLR4. Wiederum wurde dieser Effekt durch Dosierungsunterschiede wenig beeinflusst.

#### 4.2.6 Xanthinderivate: Pentoxifyllin

##### Einfluss von Pentoxifyllin auf Monozytenantigene (in vitro)

Pentoxifyllin kam das in den Dosierungen  $10^{-3}$  M/ml und  $10^{-6}$  M/ml zum Einsatz.

Tabelle 13: Modulation der Expression monozytärer Antigene unter dem Einfluss von Pentoxifyllin

Pentoxifyllin	Versuch	Expression der Antigene (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)
CD14++	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt
	Zugabe von Pentoxifyllin auf unstimulierte Monozyten	in etwa gleich bleibend, zum Messpunkt „72 Stunden“ geringe Verminderung, geringe Unterschiede zwischen den Dosierungen
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend
	Zugabe von Pentoxifyllin auf stimulierte Monozyten	vermehrt bei niedrigerer Dosierung, vermindert bei höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend
CD16+	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermehrt
	Zugabe von Pentoxifyllin auf unstimulierte Monozyten	geringfügig vermindert, in niedrigerer Dosierung deutlicher
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend
	Zugabe von Pentoxifyllin auf stimulierte Monozyten	vermehrt bei niedrigerer Dosierung, vermindert bei höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend
HLA-DR	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert
	Zugabe von Pentoxifyllin auf unstimulierte Monozyten	vermindert bei höherer Dosierung

Pentoxifyllin	Versuch	Expression der Antigene (stimuliert = mit LPS vorinkubiert)
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	steigend
	Zugabe von Pentoxifyllin auf stimulierte Monozyten	in etwa gleich bleibend, zum Messpunkt „72 Stunden“ Verminderung, geringe Unterschiede zwischen den Dosierungen
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	abfallend
TLR2	Stimulation der Monozyten mit LPS	vermindert
	Zugabe von Pentoxifyllin auf unstimulierte Monozyten	vermehrt bei niedrigerer Dosierung, vermindert bei höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend
	Zugabe von Pentoxifyllin auf stimulierte Monozyten	vermehrt bei niedrigerer Dosierung, verminderte Expression bei höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend
TLR4	Stimulation der Monozyten mit LPS	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend
	Zugabe von Pentoxifyllin auf unstimulierte Monozyten	vermehrt bei niedrigerer Dosierung, verminderte Expression bei höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei unstimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend
	Zugabe von Pentoxifyllin auf stimulierte Monozyten	vermehrt bei niedrigerer Dosierung, verminderte Expression bei höherer Dosierung
	zeitlicher Verlauf der Expression bei stimulierten Monozyten	ansteigend bis zum Messzeitpunkt „48 Stunden“/ danach abfallend

### Effekt von Pentoxifyllin auf die CD14 und CD16-Expression:

Die Veränderung der Expression von CD14 und CD16 unstimulierter Monozyten wurde durch die Zugabe von Pentoxifyllin kaum verändert und es bestanden nur geringe Unterschiede bei den eingesetzten Dosierungen. Nach 72 Stunden kam es zu einer geringfügigen Verminderung der Expression. Die Effekte bei LPS stimulierten Monozyten waren etwas deutlicher. So wurde CD14 und auch CD16 bei der niedrigeren Dosierung von  $10^{-6}$  M vermehrt exprimiert, wogegen es bei einer höheren Dosierung ( $10^{-3}$  M) zur Verminderung der Expression kam (Abbildung 80).

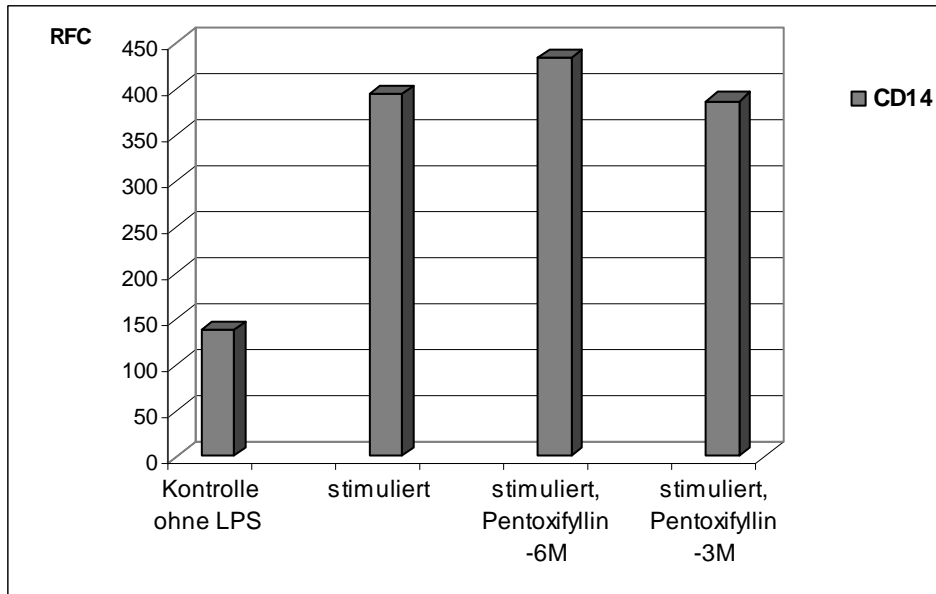


Abbildung 80: Expression von CD14 unter dem Einfluss von Pentoxifyllin zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden

### Effekt von Pentoxifyllin auf die HLA-DR-Expression:

Die Expression von HLA-DR unter Pentoxifyllin hatte im Gegensatz zu CD14 und CD16 auch bei unstimulierten Monozyten einen deutlicheren Effekt. In höherer Dosierung kam es zu einer Verminderung der Expression. Pentoxifyllin verstärkte die sinkende HLA-DR-Expression durch bakterielles Lipopolysaccharid (Abbildung 81).

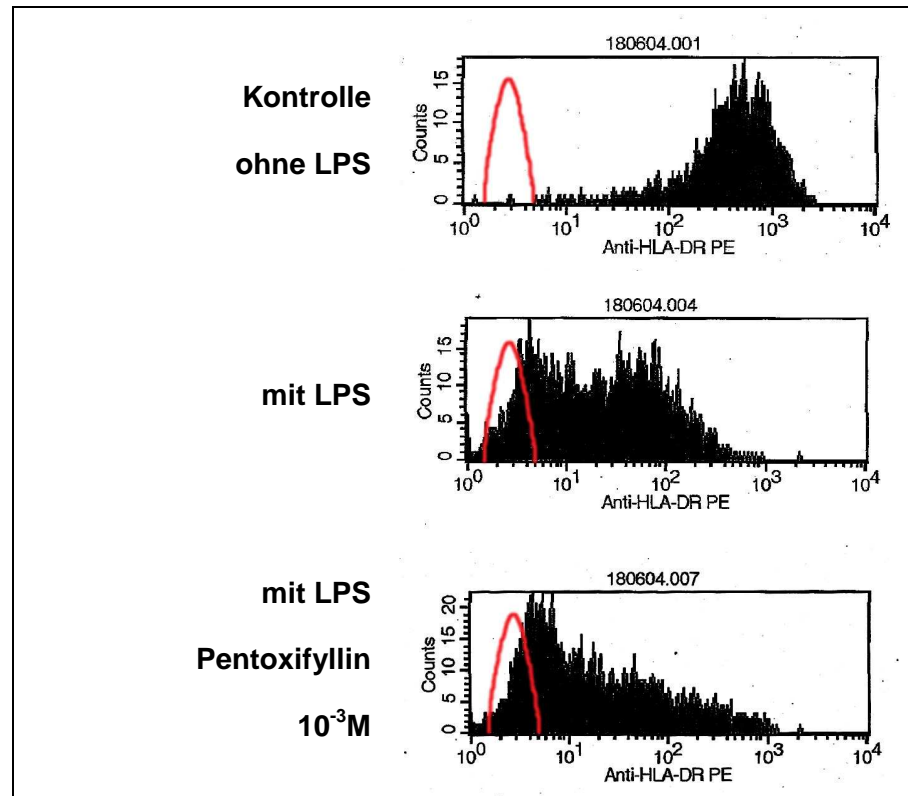


Abbildung 81: Pentoxifyllin-induzierter Shift monozytärer HLA-DR-Expression zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden, rote Linie: schematische Darstellung der Isotypkontrolle

### Effekt von Pentoxifyllin auf die TLR2- und TLR4-Expression:

TLR2 wurde sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Monozyten bei niedrigerer Dosierung vermehrt, bei höherer Dosierung vermindert exprimiert (Abbildungen 82-83).

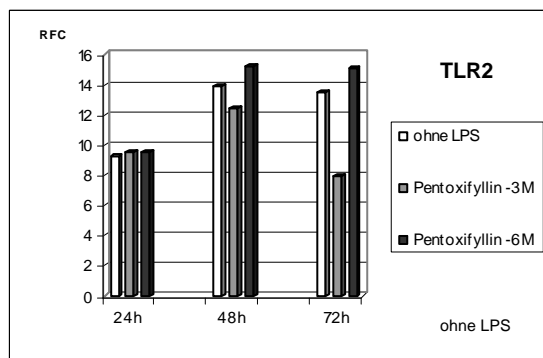


Abbildung 82: Dosisabhängige TLR2 Expression auf CD14++ unstimulierter Monozyten

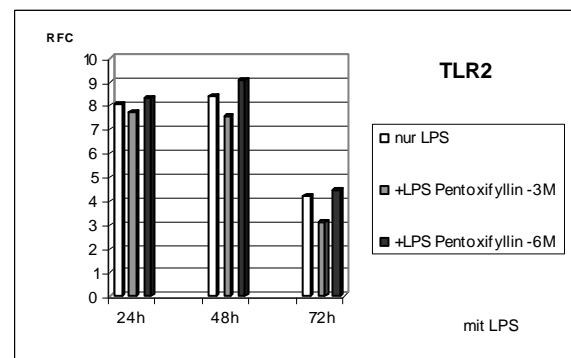


Abbildung 83: Dosisabhängige TLR2 Expression auf CD14++ stimulierter Monozyten

Dieser Effekt wiederholte sich auch für TLR4 bei unstimulierten und stimulierten Monozyten: Vermehrte Expression bei niedrigerer Dosierung, verminderte Expression bei höherer Dosierung.

Insgesamt sind über die Untersuchungen mit Pentoxifyllin keine eindeutigen Aussagen möglich.

### 4.3 Spenderspezifische Aspekte

Insgesamt fanden isolierte Monozyten aus dem Blut von 33 Spendern Verwendung. Ein Vergleich der zahlreichen Kontrollansätze untereinander verdeutlichte die spezifische Rezeptorexpression. Ausnahmen gab es bei vereinzelt Spendern (fünf aus 33):

CD14 und CD16 wurden regelmäßig nach dem Kontakt mit LPS vermehrt exprimiert. Bei vier Spendern fiel jedoch die Expression der beiden Rezeptoren nach Inkubation der isolierten Monozyten mit LPS ab. Eine Spenderausnahme tauchte bei den Untersuchungen von Erythropoietin auf und soll im folgenden für die untersuchten Rezeptoren CD14, CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4 beispielhaft dargestellt werden: CD14 wurde innerhalb dieser Spenderausnahmen durch LPS nicht hochreguliert, sondern in der Expression gehemmt. Erst die zusätzliche Erythropoietin-Vorinkubation erhöhte die CD14 Expression (Abbildungen 84- 85).

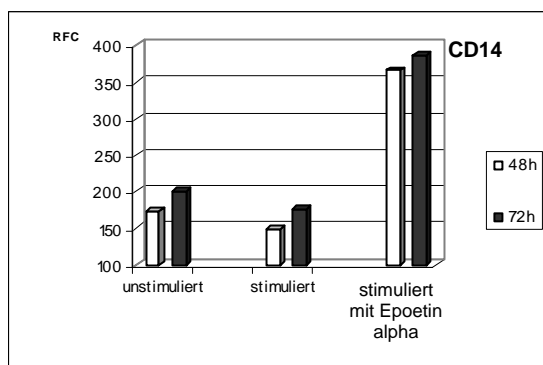


Abbildung 84: CD14 wurde nach LPS-Kontakt vermindert statt wie erwartet erhöht exprimiert. Auf zusätzlich mit Epoetin alpha-vorinkubierten Monozyten erhöhte sich die CD14 Expression. Spenderausnahme!

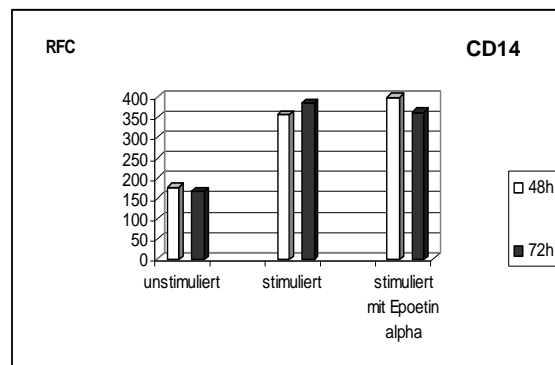


Abbildung 85: CD14 reagierte auf LPS-Kontakt wie regelmäßig gesehen mit Erhöhung der Expression. Die zusätzliche Epoetin alpha-Vorinkubation zeigte darauf nur geringen Einfluss.

Der Spender, dessen CD14 Expression bei der Untersuchung von Epoetin alpha nach LPS-Kontakt abfiel, zeigte ebenfalls eine verminderte CD16-Expression. Auch hier kam es nach Epoetin alpha-Vorinkubation bei stimulierten Monozyten zu einer deutlich erhöhten Expression von CD16. LPS hatte auf die HLA-DR Expression im allgemeinen einen deutlich hemmenden Effekt. Die bei dem Spender beschriebenen Ausnahmen nach LPS-Kontakt zeigten sich auch bei HLA-DR: Es kam zu keinem Abfall der HLA-DR-Expression durch LPS. Jedoch wurde auch hier durch die Vorinkubation mit Epoetin alpha die erwartete Reaktion, im Falle von HLA-DR eine Verminderung der Expression, hervorgerufen. Die zu erwartende Verminderung der Expression von TLR2 und TLR4 durch LPS war bei dem Spender, der auch mit den Rezeptoren CD14, CD16 und HLA-DR kontrovers reagierte, nicht festzustellen.



Bei den Untersuchungen von LDL und e-LDL reagierte ein Spender unerwartet mit einer extremen Erhöhung der TLR2 und TLR4 Expression auf den Kontakt mit dem enzymatisch modifizierten Lipoprotein e-LDL (Abbildung 86). Im Regelfall bewirkte e-LDL (im Gegensatz zu LDL) eine Erhöhung der Expression von TLR2

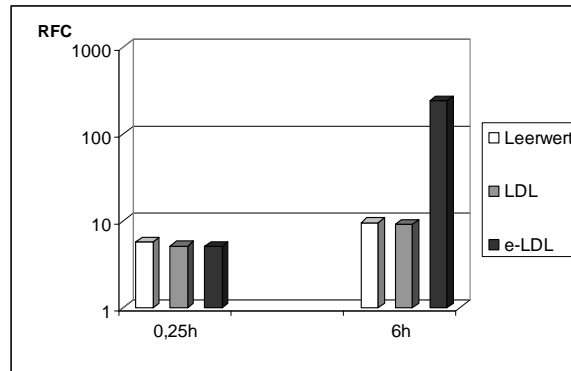


Abbildung 86: Stark ausgeprägte Reaktion des TLR2-Rezeptors auf Inkubation mit e-LDL nach sechs Stunden Kulturzeit. Der Spender war männlich und 30 Jahre alt. In der Untersuchungsserie hat TLR2 und TLR4 allein dieses Spenders in dieser Weise auf e-LDL reagiert.

## 5 Diskussion

Je mehr wir über die Funktionen und Zusammenhänge in der vorliegenden Arbeit untersuchter immunrelevanter Rezeptoren herausfinden, desto näher rückt die klinische Umsetzung dieses Wissens. Um eine sichere diagnostische, therapeutische und prognostische Anwendung zu gewährleisten, werden standardisierte Serienanalysen nötig sein. Diese sind unter Praxisbedingungen oft schwer durchzuführen. Für die Isolierung humaner Monozyten und einen in vitro Versuchsansatz benötigt man Blut in einer Menge, wie es unter Studienbedingungen im Klinikalltag kaum vertretbar ist (100ml und mehr). Tiermodelle allein genügen jedoch nicht, da die Ergebnisse nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind. Für unsere Untersuchungen spendeten gesunde männliche Versuchspersonen Blut für in vitro Monozytenkulturen. Durch die Mehrfachansätze einzelner Versuche erhärtet sich die Relevanz der Ergebnisse. Auf diesem Weg lassen sich spezifische Rezeptoreigenschaften erarbeiten, die mit Daten aus der Praxis ergänzt und verknüpft werden müssen.

Hinweise auf klinische Relevanz von Expressionsveränderungen der hier untersuchten Rezeptoren CD14, CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4 gibt es bereits: Eine verminderte monozytäre Expression von HLA-DR wird bei auftretenden Infektionen bereits als Verlaufskontrolle bei Patienten verwendet (Hanisch 2003). Lissauer et al. zeigten, dass die bei Toll-like Rezeptoren eine Signalkaskade induzierenden Gene schon 24 Stunden vor einer klinisch möglichen Diagnose der Sepsis vermehrt exprimiert wurden. Da der Verlauf einer Sepsis auch vom frühen Zeitpunkt einer Behandlung abhängt, stellt die Erfassung dieser genetischen Unterschiede ein neues therapeutisches Ziel dar (Lissauer et al. 2008). Eine Studie von Farmaciotis und Scherberich zeigt den Zusammenhang zwischen TLR2 Expression und Nierentransplantatsfunktion: Niedrige TLR2 Expression korrelierte mit stabilen Serumkreatinin, geringerer Proteinurie und dauerhafter Transplantatstabilität (Farmaciotis, Scherberich 2008).

In einer Zusammenfassung diskutierten Ishii et al. 2006 diverse Einsatzmöglichkeiten TLR-modulierender Agentien zur therapeutischen Applikation. TLR-Agonisten werden z.B. als Adjuvantien für Impfstoffe getestet, während TLR-Antagonisten als antiinflammatorische oder antiautoimmune Agenzien eingesetzt werden könnten.

Sheu et al. untersuchten den Expressionsverlauf des Toll-like Rezeptors 4 bei Patienten mit Herzerkrankungen. Bei ihnen fanden sich gegenüber den Kontrollpersonen signifikant höhere TLR4 Expression und TNF-alpha Konzentration im Blut bzw. Serum. Die Bewertung des

LPS-aktivierten Toll-like Rezeptors 4 dieser Patienten gab prognostischen Aufschluss: Erhöhte TLR4 Expression korrelierte mit schlechtem klinischem Ausgang (Sheu et al. 2008).

Die auf peripheren Blutmonozyten vorkommenden Rezeptoren CD14 und CD16 sind in verschiedenen Subsets ausgeprägt. Flowzytometrisch untersuchte Monozyten im Vollblut weisen das charakteristische Bild mit Aufschlüsselung der Subsets CD14<sup>++</sup>, CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> auf (Abbildung 87).

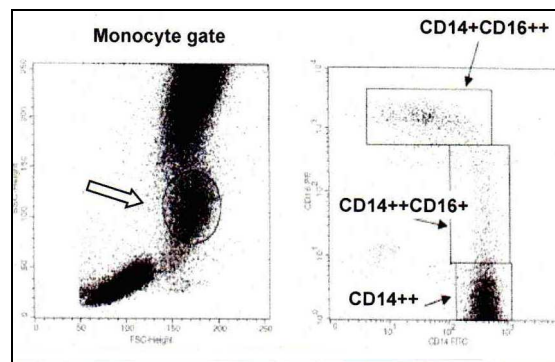


Abbildung 87: Flowzytometrisch untersuchtes Vollblut (links) und Subsets peripherer Blutmonozyten (rechts)

Bei aktivierten (proinflammatorischen) Monozyten verschieben sich die Subsets zugunsten des Fc-gamma III Rezeptors CD16. Derartig aktivierte Monozyten finden sich beispielsweise bei Nierenerkrankungen und bei Patienten, die sich einer ambulatorischen Peritonealdialyse (CAPD) unterzogen: In einer zeitgleich durchgeführten Untersuchung am selben Institut untersuchten Lambert et al. die Ausprägung der funktionellen Antigene CD14, CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4 und die Subsets peripherer Blutmonozyten während einer Patientenbehandlung mittels peritonealer Dialyse (CAPD) im Vergleich zu gesunden Kontrollen. CD14 war auf allen Subsets hochreguliert, ebenso die proinflammatorischen CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> und CD16<sup>+</sup> Phänotypen ( $p < 0,05$ ). Während auf HLA-DR, extrazellulären TLR2 und TLR4 kein signifikanter Unterschied zu finden war, zeigte sich die intrazelluläre Expression von TLR2 und TLR4 im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich vermindert (Abbildungen 88-89). Erhöhte CD14 Expression und hochregulierte proinflammatorische Subsets (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>) verweisen auf ein erhöhtes Risiko entzündlicher Zwischenfälle. Verminderte Expression intrazellulärer TLR deutet auf eine Fehlfunktion der TLR-Internalisation in die Endosomen der antigenpräsentierenden Zellen hin (Lambert et al. 2008).

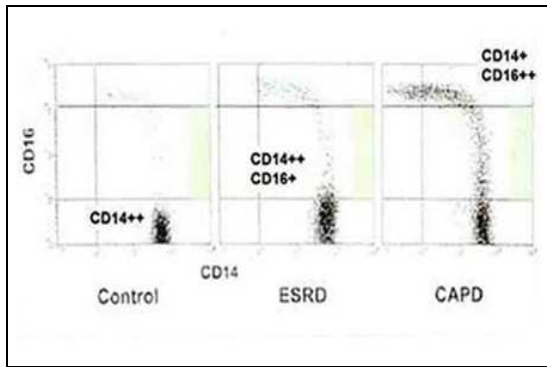


Abbildung 88: Subsets peripherer Blutmonozyten und deren Verteilung: Gesunde Kontrolle ganz links, Verschiebung zugunsten des Fc-gamma III Rezeptors CD16 bei ESRD (Endstage renal disease) und CAPD (Chronic ambulatory peritoneal dialysis) (Lambert et al. 2008)

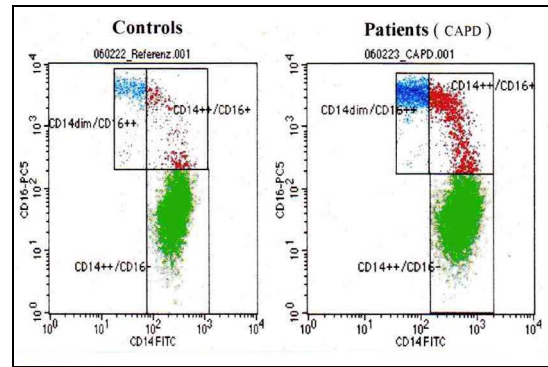


Abbildung 89: Subsets peripherer Blutmonozyten: CD14++CD16- (grün), CD14++CD16+ (rot), CD14++CD16++ (blau), vermehrt proinflammatorische Zellen (rote und blaue Subsets) bei Patienten mit Behandlung durch ambulante Peritonealdialyse (CAPD) (Lambert et al. 2008)

## 5.1 Allgemeine Analysen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuchsansätze mehrfach wiederholt. Der Expressionsverlauf über die Kulturzeit sowie die Reaktion monozytärer Rezeptoren auf LPS dienten regelmäßig als Kontrollreferenzen. Daher haben diese allgemeinen Analysen hohe Aussagekraft: Der Spontanverlauf der monozytären Expression von CD14, CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4 über die Kulturzeit veränderte sich in charakteristischer Weise: Die Expression von CD14 sowie von CD16 stieg im Verlauf der Zellkultur langsam aber kontinuierlich an. Der Effekt weist auf eine sich spontan verstärkende Expression dieser Rezeptormoleküle hin. Durch den Kontakt mit LPS wurden Monozyten stimuliert. Die Rezeptorexpression von CD14 (äquivalent von CD16) derart aktivierter Monozyten stieg im Vergleich zu unstimulierten Zellen signifikant an. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Zellkultur, war auch bei den mit LPS beschickten Monozyten eine Erhöhung der Expression von CD14 und CD16 zu beobachten. Die HLA-DR Expression unstimulierter Monozyten stieg während der Dauer der Zellkulturzeit kontinuierlich und deutlich an. LPS hemmte dagegen die Expression des HLA-DR-Rezeptors. Eine deutlich zu beobachtende Abregulierung der Rezeptorexpression im Vergleich zu unstimulierten Monozyten war die Folge. Charakteristisch für TLR2 und TLR4 war deren initialer Anstieg zu Beginn der Zellkultur bis zur Messung nach 48 Stunden mit anschließendem Abfall der Expression. Dieser Effekt ließ sich sowohl bei unstimulierten als auch mit bakteriellem Lipopolysaccharid stimulierten Monozyten beobachten. LPS interagiert bei den vorliegenden in vitro-Versuchen mit der Expression von TLR2. Der TLR4-Rezeptor zeigte am Anfang der Kulturzeit kaum Unterschiede und reagierte auf LPS erst zur Messung nach 72 Stunden wie der TLR2-Rezeptor mit einer Abregulierung (Tabelle 14).

Tabelle 14: Überblick über die Ergebnisse allgemeiner Analysen der untersuchten Rezeptoren (CD14, CD16, HLA-DR, TLR2, TLR4), Veränderung der Rezeptorexpression im Verlauf der Kulturzeit und unter dem Einfluss von Lipopolysaccharid

<b>CD14 und CD16</b>	<b>Zeit</b> →	↑
<b>CD14 und CD16</b>	<b>LPS</b> →	↑ ↑ ↑
<b>HLA-DR</b>	<b>Zeit</b> →	↑
<b>HLA-DR</b>	<b>LPS</b> →	↓ ↓ ↓ ↓
<b>TLR2 und TLR4</b>	<b>Zeit</b> →	↑ (48h) ↓ (72h)
<b>TLR2 und TLR4</b>	<b>LPS</b> →	↑ (48h) ↓ (72h)

## 5.2 Erythropoietin

Das durch seine Aufgaben der Stimulierung der Erythropoese im Knochenmark und der Verhinderung der Apoptose erythropoetischer Vorläuferzellen bekannt gewordene Erythropoietin (EPO) gehört zur Gruppe der Glykoproteine. Bildungsorte des Erythropoietin sind zu 90% die interstitiellen Zellen des peritubulären Kapillarnetzes der Nieren neben Leber und Milz. Die Expression erfolgt verstärkt nach hypoxischen Zuständen über eine Induktion durch Kinasen und reaktiver Sauerstoffspezies. Daneben wird Erythropoietin auch im Gehirn während und nach neuropathologischen Traumata gebildet. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen eine zusätzliche antiinflammatorische Wirkung dieser Substanz vermuten.

In Gegenwart von Epoetin alpha kam es zu einer Verminderung der Expression von CD14 und CD16. Dieser Effekt von Epoetin alpha blieb auch bei stimulierten Monozyten nach Endotoxin-Exposition erhalten. Epoetin alpha und LPS interagieren somit antagonistisch, da LPS allein eine Erhöhung der Expression von CD14 und CD16 bewirkt. LPS reguliert die Expression von HLA-DR in Monozytenkulturen dramatisch nach unten. Ähnliche Reaktionen werden bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen beobachtet. Epoetin alpha bewirkt auch bei HLA-DR einen gegenläufigen Effekt zum bakteriellen Lipopolysaccharid. Die abfallende HLA-DR-Expression wird aufgehalten, es kommt sogar zu einem Anstieg sowohl bei unstimulierten als auch bei Endotoxin-stimulierten Monozyten. Im Gegensatz zur vermehrten HLA-DR-Expression durch Epoetin alpha nach Vorinkubation mit LPS zeigte sich bei der Epoetin alpha-Vorinkubation und späterer LPS-Exposition eine verminderte HLA-DR-Expression sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Monozyten (Tabelle 15).

Tabelle 15: Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Rezeptoren CD14 und CD16 sowie HLA-DR unter dem Einfluss von Erythropoietin. (Anzahl der Pfeile verweist auf Intensität der Expressionsveränderung)

<b>CD14 und CD16</b>	<b>LPS</b> →	↑ ↑ ↑
<b>CD14 und CD16</b>	<b>Epoetin alpha</b> →	↓ ↓ ↓
<b>HLA-DR</b>	<b>LPS</b> →	↓ ↓ ↓ ↓
<b>HLA-DR</b>	<b>LPS-Vorinkubation + EPO</b> →	↑ ↑ ↑
<b>HLA-DR</b>	<b>EPO-Vorinkubation + LPS</b> →	↓ ↓ ↓

Diese Ergebnisse bestätigen eine Arbeit von Cuzzocrea et al., bei der ein antiinflammatorischer Effekt von EPO im Zusammenhang mit Kollagen-induzierter Arthritis untersucht wurde: Bei Mäusen reduzierte sich durch Erythropoietin signifikant die Plasmakonzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$ . Ebenso verringerte EPO die chondrozytäre Apoptose im Gelenkknorpel (Cuzzocrea et al. 2005). Zusätzlich zur reduzierten TNF- $\alpha$ -Produktion durch EPO stellten bereits 1998 Bryl et al. eine erhöhte IL-10-Produktion bei Hämodialysepatienten fest. Überstimulierte T-Lymphozyten und Monozyten/ Makrophagen beeinträchtigten durch erhöhte Anteile proinflammatorischer Zytokine die Immunantwort. Durch eine Behandlung mit EPO ließ sich bei diesen Patienten die Immunsituation verbessern (Bryl et al. 1998).

Im generalisierten System lokalen Gewebeschatzes spielt EPO eine wichtige Rolle. In einer Studie mit Knockout-Mäusen wurde die Existenz von Erythropoietin-Rezeptoren im Herzen gezeigt: Hoch dosierte Gaben von Erythropoietin schützten vor den Konsequenzen eines koronaren Arterienverschlusses. Reduzierte Myokarddefekte sollen im Zusammenhang mit verminderter Apoptose stehen. Dieser Zusammenhang wird auch beim Schutz der Nieren vor Reperfusionsschäden nach einer Ischämie diskutiert (Parsa et al. 2003). Systemisch angewandtes Erythropoietin soll bei neuronalen Traumata gewebeschatzend wirken, wie in verschiedenen Tiermodellen beschrieben: Durch Sauerstoffmangel verursachte Gehirntraumata basieren auf primären Neuronenverlust und entzündlichen Antworten. Durch Erhalt vaskulärer Autoregulation, Abschwächung apoptotischer und entzündlicher Ursachen des Zelltoedes und Ansammlung von Stammzellen in der Schadensregion beeinflusst EPO die Regeneration nach Gehirn- und Rückenmarkstraumata. Auch in vitro verhinderte EPO neuronale Apoptose (Calvillo et al. 2003, Ghezzi et al. 2004). In einer weiteren Studie reduzierte EPO die Astrozytenaktivierung und Ansammlung von Leukozyten und Mikroglia in Infarktzoenen des Gehirns. Zusätzlich verminderte sich die durch Ischämie induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL6 und Protein1, ein Lockstoff für Monozyten (Villa et al. 2003). Trial et al. untersuchten 2004 den Einfluss von EPO auf endotheliale Zellen in

vitro. Diese reagierten auf EPO mit Proliferation und Angiogenese. Ein Abfall der EPO-Konzentration veränderte die Interaktion endothelialer Zellen mit Makrophagen. Das Ergebnis war eine Erythrophagozytose, bei der überraschenderweise die jungen Formen der Erythrozyten zerstört wurden. Die Ursache lag vermutlich in einer verminderten Produktion des Makrophagen-deaktivierenden „growth factor-beta“ (TGF- $\beta$ ) durch die endothelialen Zellen. Der resultierende proinflammatorische Phänotyp veranlasste möglicherweise die Produktion von Thrombospondin durch Makrophagen. Dieses Thrombospondin formt Brücken zwischen Adhäsionsmolekülen auf jungen roten Blutzellen (CD36) und einem Komplex auf der Makrophagenoberfläche, der die Phagozytose induziert. EPO zeigt somit eine antiinflammatorische Wirkung und kann Erythrophagozytose durch Makrophagen verhindern (Trial et al. 2004). Erythropoietin scheint die Embryonalentwicklung zu beeinflussen: Mäuseembryonen mit einer Mutation des Erythropoietinrezeptors zeigten Fehlentwicklungen von Gehirn, Herz und Blutgefäßen (Rossert et al. 2005).

In den vorliegenden Versuchen erhöhte Epoetin alpha die TLR2- und TLR4-Expression bei unstimulierten und LPS-stimulierten Monozyten. Die Ergebnisse unterstützen die Ansicht, dass nicht nur mikrobielle Komponenten mit TLRs interagieren. Somit kann neben gramnegativen Bakterien, HSP-70 und Komponenten der extrazellulären Matrix auch Erythropoietin TLR2 und TLR4 modulieren. Dagegen zeigten Monozyten, die erst nach der EPO-Exposition mit Endotoxin-stimuliert wurden, einen Abfall der TLR2- und TLR4-Expression (Tabelle 16).

Tabelle 16: Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Rezeptoren TLR2 und TLR4 unter dem Einfluss von Erythropoietin. (Anzahl der Pfeile verweist auf Intensität der Expressionsveränderung; 48h und 72h: Zeitpunkt der Messung nach Kulturbeginn)

<b>TLR 2 und TLR4</b>	<b>LPS</b> →	<b>↑ (48h) ↓ (72h)</b>
<b>TLR 2 und TLR4</b>	<b>LPS-Vorinkubation + EPO</b> →	<b>↑ ↑</b>
<b>TLR 2 und TLR4</b>	<b>EPO-Vorinkubation + LPS</b> →	<b>↓ ↓</b>

Eingesetzt wird EPO in der Therapie von Anämien, wie sie z.B. bei fortgeschrittenem Nierenversagen und beim Einsatz von Chemotherapeutika sowie antiretroviralen Medikamenten vorkommen. Anämien bei Frühgeburten, rheumatoider Arthritis und Myelodysplasien reagieren ebenfalls auf eine Therapie mit EPO. Zusätzlich findet Erythropoietin mittlerweile sowohl bei Patienten mit tumorösen Erkrankungen als auch bei entzündlichen und infektiösen Krankheitsbildern Verwendung. Der klinische Einsatz als Gewebeschutz bei neuropathologischen Erkrankungen wie Gehirnfarkt, Kopf- und Rückenmarkstrauma und Toxin-induzierten epileptischen Anfällen wird diskutiert (Eid et al. 2002).

### 5.3 Bisphosphonate

Bisphosphonate sind eine neue Gruppe osteotroper Medikamente, die in den letzten 25 Jahren für diagnostische und therapeutische Zwecke bei verschiedenen Knochen- und Kalziumstoffwechselkrankheiten entwickelt wurden. Bisphosphonate weisen eine hohe Affinität zu Strukturen der Knochenoberfläche auf, vor allem im Bereich der Resorptionslakunen zwischen den Osteoklasten und der arrodieren Knochenoberfläche. Dies führt zu wirksamer Osteoklasten-Hemmung mit verminderter Knochenresorption, zu Reaktivierung der supprimierten Osteoblasten und damit insgesamt zu einer positiven Bilanz der Knochenmasse. Bisphosphonate werden auch bei der Behandlung der Osteodystrophia deformans und der Osteoporose eingesetzt.

Neuere Untersuchungen belegen einen antiproliferativen Effekt der Bisphosphonate auf das Tumorstwachstum. Osteoklastenhemmung führt zu verminderter Produktion von IL-6 und zu verminderter Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix. Es gibt inzwischen auch Hinweise, dass Bisphosphonate die Entstehung ossärer und wahrscheinlich auch viszeraler Metastasen reduzieren. Die Ursache dafür liegt möglicherweise in der Beeinflussung von Adhäsionsmolekülen der Tumorzellen und einer Beschichtung der Knochenoberfläche mit einem Bisphosphonatfilm (Boissier et al. 1997). Kürzlich identifizierte Gamma-Delta-Liganden von T-Zellen weisen strukturelle Ähnlichkeit mit Bisphosphonaten auf. Bei einer Studie induzierte Ibandronat eine signifikante Expansion dieser Gamma-Delta-T-Zellen in vitro. Eine Aktivierung der T-Zellen mit konsekutiv vermehrter Expression verschiedener CD-Rezeptoren erfolgte ohne den Einfluss exogener Zytokine. Proliferative Effekte auf die Zellen waren dagegen IL-2-abhängig (Kunzmann et al. 2001). Ein Vergleich von Ibandronat mit Pamidronat, beides Substanzen aus der Bisphosphonat-Gruppe, ergab deutliche Unterschiede. Pecherstorfer et al. untersuchten den Einfluss beider Substanzen auf zirkulierende Lymphozyten-Subpopulationen nach intravenöser Injektion. Patienten nach einer Pamidronat-Behandlung zeigten signifikanten Anstieg der mittleren Körpertemperatur innerhalb von zehn Stunden und signifikanten Abfall von zirkulierenden Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, T-Zellen und CD4+ und CD8+ T-Zellen. Die Ibandronat-Behandlung beeinflusste die mittlere Körpertemperatur nicht und war mit einem deutlichen Anstieg von Gesamt-Lymphozyten, B-Zellen, T-Zellen und CD4+ und CD8+ T-Zellen verbunden. Bis zu 60% der Patienten erleiden nach der ersten Pamidronat-Infusion eine Akute-Phase-Reaktion. Die Untersuchungsergebnisse sprechen für eine Freisetzung von TNF- $\alpha$ , dessen Quelle T-Zellen in der Akute-Phase-Reaktion sein könnten (Pecherstorfer et al. 2000).

Die beschriebenen Effekte aus den beiden Arbeitsgruppen zeigen, dass Bisphosphonate auf das Immunsystem Einfluss nehmen. Dies wird auch durch die eigenen Untersuchungen bes-



tätigt: In den vorliegenden Versuchen verminderte sich durch Ibandronat die Expression des CD14-Rezeptors sowohl bei unstimulierten als auch bei LPS stimulierten Monozyten. Das Ausmaß der Änderung war in niedrigerer Dosierung ausgeprägter. CD16 unstimulierter Monozyten wurde ebenfalls vermindert exprimiert. Der Fc-γ-III-Rezeptor stimulierter Monozyten zeigte keine eindeutigen Änderungen nach Ibandronat-Exposition. Auch HLA-DR und TLR2 stimulierter Zellen reagierten mit nur geringfügigen und nicht eindeutigen Änderungen ihrer Expression. Nach einem anfänglichen Anstieg fiel die HLA-DR und TLR2 Expression bei unstimulierten Monozyten nach 48 Stunden ab. Der TLR4-Rezeptor reagierte insgesamt mit einer geringgradigen Erhöhung der Expression (Tabelle 17).

Tabelle 17: Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Rezeptoren (CD14, CD16, HLA-DR, TLR2, TLR4) unter dem Einfluss von Ibandronsäure. (Anzahl der Pfeile verweist auf Intensität der Expressionsveränderung; ~~~~: kein eindeutiges Ergebnis)

<b>CD14 und CD16</b>	<b>LPS</b> →	↑ ↑ ↑
<b>CD14</b>	<b>Ibandronat mit &amp; ohne LPS</b> →	↓ ↓ ↓
<b>CD16</b>	<b>Ibandronat ohne LPS</b> →	↓ ↓ ↓
<b>HLA-DR und TLR2</b>	<b>Ibandronat ohne LPS</b> →	↓
<b>CD16, HLA-DR und TLR2</b>	<b>Ibandronat + LPS</b> →	~~~~~
<b>TLR4</b>	<b>Ibandronat</b> →	↑

## 5.4 Glukokortikoide:

Bildungsort der zur Gruppe der Steroidhormone gehörenden Glukokortikoide ist die Nebennierenrinde. Das wichtigste natürlich vorkommende Glukokortikoid ist das Cortisol. Neben der Stimulation der Glukoneogenese, der Wirkungen auf Hämatopoese, Muskel-, Wasser-, Elektrolyt- und Eiweißstoffwechsel zeigt diese Substanzgruppe deutliche antiinflammatorische Eigenschaften. Durch einen Hemmeffekt auf die lymphozytäre Eiweißsynthese und hypertrophierende Wirkung auf Lymphknoten und Thymus vermindert sich die zellvermittelte Immunität. Die Proliferation von Fibroblasten und entzündlichem Granulationsgewebe wird gehemmt. Glukokortikoide beeinflussen auch das mononukleäre Phagozytensystem. Bei Monozyten und Makrophagen identifizierten Werb et al. hochaffine Glukokortikoid-Rezeptoren (Werb et al. 1978). Anwendung dieser Substanzgruppe in vivo führt durch veränderte Monozytenkinetik zu Monozytopenie und mangelhafter Ansammlung der Zellen in den entsprechenden Entzündungsgebieten. Die Fähigkeit zur Chemotaxis und mikrobiellen Aktivität wird verringert. Zusätzlich vermindert sich die Sekretion von Proteinasen wie dem

Angiotensin-Converting Enzym oder von Kollagenasen. Dieser Zusammenhang verdeutlicht, warum Glukokortikoide die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF unterdrücken (Nockher et al. 1997).

Aufgrund dieser Eigenschaften spielen Glukokortikoide eine wichtige Rolle bei der klinischen Therapie entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen. Besonders in der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen und in der Transplantationsmedizin werden Glukokortikoide im Hinblick auf ihre immunsuppressive Wirkung eingesetzt. Bei akuter Entzündung jedoch erhöht sich die Gefahr sekundärer Infektionen unter hochdosierter Glukokortikoid-Therapie. Neuere Studien zeigen im Gegensatz dazu einen positiven Effekt niedrigdosierter Glukokortikoid-Therapie bei septischem Schock. Neben verbesserter hämodynamischer Stabilität bei Patienten erhöhte sich *in vitro* die Phagozytoseleistung sowie die Expression monozytenaktivierenden Zytokins IL-12 (Keh et al. 2003). Diese Ergebnisse sprechen sogar für eine immunstimulierende Rolle der Glukokortikoide zu Beginn der Abwehrreaktion eines Organismus gegen eine septische Erkrankung. Bei spezifischen Genen aktivierter Zellen des Immunsystems verminderte sich durch Glukokortikoide deren Expression, wogegen sie bei ruhenden Zellen unter dem Einfluss der Substanz vermehrt war. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Konzentration von IL-12 bei Patienten mit einer septischen Erkrankung während einer Glukokortikoidtherapie erhöht, unter nicht-septischen Bedingungen jedoch vermindert war (Bornstein et al. 2003). Somit muss die dogmatische Ansicht in Frage gestellt werden, dass Glukokortikoide rein immunsuppressive Wirkung haben.

Auch im vorliegenden Versuch zeigten Glukokortikoide deutliche immunmodulatorische Wirkung. In Gegenwart von Prednisolon verminderte sich die Expression von CD14 und CD16. Dieser Effekt durch Prednisolon zeigte sich auch bei Endotoxin-stimulierten Monozyten. Prednisolon und LPS interagierten somit antagonistisch: LPS allein bewirkte eine erhöhte CD14 und CD16 Expression. Bestätigt werden diese Ergebnisse von Dayyani et al.: Bei einer Studie mit gesunden Versuchspersonen verringerte Prednisolon die Expression von CD14+CD16+ um 50% nach 24 Stunden und um 95% am Tag fünf nach Infusion des Glukokortikoids. Auch *in vitro* kam es dosisabhängig zu einer rückläufigen Expression (Dayyani et al. 2003). Bei Vorinkubation mit Prednisolon und anschließender Endotoxin-Exposition bestätigt sich im vorliegenden Versuch der sowohl positive als auch negative Effekt von Glukokortikoiden auf das Immunsystem: Auf unstimulierte Monozyten hatte Prednisolon zwar wieder eine verminderte Expression zur Folge, mit Endotoxin konfrontierte Zellen reagierten jedoch mit einer Erhöhung der Expression des CD14 und CD16 Rezeptors (Tabelle 18). Im Lauf einer Sepsis spielt die Deaktivierung der Monozyten eine große Rolle. Die resultierende Immunsuppression ist assoziiert mit einer Verminderung der HLA-DR-Expression. Bei Sep-

sispatienten besteht eine Korrelation dauerhaft niedriger HLA-DR-Konzentrationen mit einem tödlichen Ausgang des Krankheitsgeschehens. Bei diesen Patienten fiel auch eine erhöhte Konzentration an endogenem Cortisol auf (Le Tulzo et al. 2004). In den vorliegenden in vitro-Versuchen bewirkte Prednisolon bei HLA-DR einen ebenfalls vermindernenden Effekt auf die Expression: Das Abfallen der HLA-DR Expression verstärkte sich (Tabelle 18). Auch dies spiegelt sich in der Studie von Dayyani et al. wider: HLA-DR wurde bei gesunden Versuchspersonen nach der Gabe von Prednisolon vermindert exprimiert (2003).

Tabelle 18: Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Rezeptoren CD14 und CD16 sowie HLA-DR unter dem Einfluss von Prednisolon. (Anzahl der Pfeile verweist auf Intensität der Expressionsveränderung)

<b>CD14 und CD16</b>	<b>LPS</b> →	↑ ↑ ↑
<b>CD14 und CD16</b>	<b>Prednisolon</b> →	↓ ↓ ↓
<b>HLA-DR</b>	<b>LPS</b> →	↓ ↓ ↓ ↓
<b>HLA-DR</b>	<b>Prednisolon</b> →	↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Für TLR2 unstimulierter Monozyten zeigte sich im vorliegenden Versuch unter dem Einfluss von Prednisolon eine vermehrte Expression, welche mit höherer Dosierung stieg. Eine Erhöhung der TLR2-Expression war auch bei stimulierten Monozyten zu beobachten. Dies galt sowohl für die Vorinkubation mit LPS als auch für die zeitlich spätere LPS-Exposition (Tabelle 19).

Tabelle 19: Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Rezeptoren TLR2 und TLR4 unter dem Einfluss von Prednisolon. (Anzahl der Pfeile verweist auf Intensität der Expressionsveränderung)

<b>TLR2</b>	<b>Prednisolon mit &amp; ohne LPS</b> →	↑ ↑ ↑
<b>TLR4</b>	<b>Prednisolon ohne LPS</b> →	↑
<b>TLR4</b>	<b>Prednisolon mit LPS</b> →	↓

Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist das Ergebnis einer Untersuchung von Homma et al., die eine erhöhte Expression von TLR2 in humanen respiratorischen Epithelzellen nach dem Kontakt mit Dexamethason nachwies (Homma et al. 2004). Auch für TLR4 bestätigte die vorliegende Arbeit den sowohl positiven als auch negativen immunmodulatorische Effekt von Prednisolon. Prednisolon erhöhte die TLR4-Expression unstimulierter Monozyten, während sich die Expression stimulierter Zellen verminderte. Dazu passen die Ergebnisse von Silverstein et al.: Bei TLR4-Knock-out-Mäusen mit resultierender verminderter Reaktion auf Endotoxin hatten Glukokortikoid-Gaben keinen schützenden Effekt bei einer Infektion mit *Escherichia coli* (Silverstein et al. 2003).

Diese Ergebnisse fordern dazu auf, den Einsatz von Glukokortikoiden in niedriger Dosierung in der Therapie der Sepsis weiter zu untersuchen. Eine Möglichkeit des Monitorings von Immunsuppression oder therapeutischen Effekten wäre die standardisierte Bestimmung der im vorliegenden Versuch untersuchten Antigene CD14 und CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4.

### 5.5 LDL und e-LDL

Cholesterol und Triglyzeride zirkulieren mit dem Blut als Bestandteil von Lipoprotein-Komplexen. Lipoproteine sind hochmolekulare, wasserlösliche Komplexe, die v.a. aus Cholesterol, Cholesterinester, Phosphatiden, Triglyzeriden und bestimmten Proteinen (Apolipoproteinen) bestehen. Lipoproteine werden in Leber und Darm synthetisiert und transportieren fettlösliche Substanzen wie Cholesterol, Lipide und fettlösliche Vitamine im Blut. Die Einteilung erfolgt in verschiedene Dichteklassen. Ein Beispiel ist LDL, das „Low Density Lipoprotein“. Es besteht zu 75% aus Lipiden (mehrere tausend Moleküle Cholesterol sowie Phospholipide) und zu 25% aus Proteinen (Proteinhülle aus Apolipoprotein B). Die Hauptaufgabe des „Low Density Lipoprotein“ ist der Transport von Cholesterol in periphere Zellen. Bei Bedarf wird LDL von Gewebezellen über Rezeptoren aufgenommen. Die Freisetzung des Cholesterols in der Zelle geschieht durch die Einwirkung zelleigener lysosomaler Enzyme, den Proteasen und Cholesterolesterasen.

Nach Bhakdi et al. verändern sich Lipoproteine durch in vitro-Behandlung mit Protease und Cholesterolesterase zu einer Einheit, die Lipoproteinpartikel atherosklerotischer Veränderungen morphologisch ähneln (enzymatisch modifiziertes LDL, e-LDL). Dieser enzymatische Umbau bringt LDL in einen fusionsfreudigen Zustand und es entstehen unterschiedlich große Partikel. Die veränderten LDL-Moleküle werden von Makrophagen rasch aufgenommen. Schaumzellbildung ist die Folge. Diese wird von der Freisetzung des MCP-1 (Monozytenchemotaktisches Protein-1) und IL-6 begleitet. Hohe e-LDL-Konzentrationen wirken zytotoxisch, so dass einige Zellen absterben (Bhakdi et al. 2002). Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Aussagen. Obwohl keine deutliche Schaumzellbildung stattfand, wiesen Monozyten bei der Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop bereits nach 15minütiger Inkubation mit e-LDL deutliche Einschlüsse von Fettpartikeln auf. Diese Fetteinschlüsse fehlten bei Monozyten nach LDL-Exposition. Sowohl bei e-LDL als auch LDL-inkubierten Monozyten fanden sich in Apoptose befindliche Zellen. Dies bestätigen auch die Ergebnisse des mikroskopischen Bildes bei der Zellkulturkontrolle. Lipoprotein-inkubierte Monozyten zeigten deutlich verringerte Vitalität.

Die Messintervalle mit drei, bzw. sechs und zwölf Stunden nach Kulturbeginn wurden in diesem Versuchsansatz sehr früh gewählt. In diesem Zeitfenster verminderte sich die Expressi-

on sowohl des CD14 als auch des CD16-Rezeptors bei den Kontrollwerten ohne Lipid. In zeitlich späteren Messintervallen anderer Versuchsansätze kam es bei den Kontrollen üblicherweise zu erhöhter Expression dieser Rezeptoren. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit der initial verstärkten Adhäsion der Monozyten an künstlichen Membranen, in diesem Fall an den Boden der Kulturschale. Ziegler-Heitbrock et al. sehen einen Zusammenhang der bevorzugten Adhäsion proinflammatorischer Monozyten (CD14+ und CD16+) an künstlichen Membranen mit der Verringerung der Anzahl dieser Zellen initial bei Hämodialyse (Ziegler-Heitbrock et al. 2007). 2001 untersuchten Nockher et al. die Verteilung monozytärer Subpopulationen bei Patienten unter Hämodialyse. Die Überprüfung einer transienten Verringerung der Expression proinflammatorischer Monozyten bei Patienten zu Beginn der Hämodialyse könnte auch einen sensitiven Test für die Biokompatibilität künstlicher Membranen darstellen. Dies ist von Bedeutung, da Adhäsion Monozyten aktiviert, diese dadurch vermehrt Zytokine produzieren und so zu Entzündungen im Rahmen einer Dialyse beitragen.

In den vorliegenden Untersuchungen stieg die HLA-DR Expression unter Einfluss der Lipoproteine LDL und vor allem e-LDL gegen Ende der Kulturzeit an (Abbildung 91). Der TLR2-Rezeptor zeigte nach dem Kontakt mit LDL in Mehrfachansätzen tendenziell eine verminderte Expression. Das enzymatisch modifizierte Lipoprotein (e-LDL) erhöhte dagegen die TLR2 Expression. Bei der durchgeführten Bestimmung des extrazellulären Toll-like Rezeptors 4 ergab sich keine eindeutige Expressionsveränderung nach dem Kontakt mit LDL als auch mit e-LDL. Die Expression des intrazellulären TLR4 zeigte eine Tendenz zur Verminderung der Expression nach Kontakt mit den Lipoproteinen (Abbildung 90).

Spenderabhängig kam es zu einigen Extremwerten bei der Rezeptorexpression nach dem Kontakt mit e-LDL. So reagierte HLA-DR einmal bereits nach 15 Minuten auf das enzymatisch veränderte Lipoprotein mit einer deutlichen Erhöhung der Expression. TLR2 und TLR4 zeigten zweimal eine extreme Erhöhung ihrer Expression nach sechs Stunden Inkubationszeit mit e-LDL. Bei unstimulierten Monozyten, die zusätzlich zu den Lipoproteinen mit Atorvastatin inkubiert werden, fehlten diese Reaktionen vollständig. Für die untersuchten Rezeptoren CD14, CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4 kommt es bei Atorvastatin plus LDL bzw. e-LDL zu einer verminderten Expression. Die Atorvastatin-Befunde waren für uns jedoch abschließend nicht endgültig beurteilbar, da ein Einfluss der Trägersubstanz für die Lösung des Statins auf die Immunphänotypie der Zellen nicht auszuschließen war.

Der Mainzer Hypothese nach Bhakdi et al. zufolge birgt jedes LDL-Molekül das atherogene Potential in sich (Abbildung 93). Gelangt ein Teil der Lipoproteine des Blutes in das Endothel der Gefäße, kommt ein physiologischer Mechanismus zum Abtransport von gewebsständi-

gen LDL-Cholesterol in Gang. Über langlebige Phagozyten versucht der Organismus, das unlösliche Cholesterol zu entfernen. Ein enzymatischer Umbau legt Bindestellen für das C-reaktive Protein frei. Eine nicht-oxidative enzymatische Degradation transformiert in die Intima arterieller Gefäße transsudiertes Low Density Lipoprotein (LDL) bereits in den initialen Stadien der Arteriosklerose zu diesem atherogenen Lipoprotein. Wird CRP gebunden, kommt es zur Komplementaktivierung und zur Anlockung von Blutmonozyten. Die Makrophagen erkennen das LDL, nehmen es auf und entfernen es aus dem Gewebe. Bei Überlastung dieses Transportsystems werden inflammatorische Zytokine freigesetzt. Infolgedessen gehen Makrophagen zugrunde und freigesetzte Lipide führen zu Komplementaktivierung. Der Prozess geht in eine chronische Entzündung über: Kalzium-Lipid-Proteinkomplexe lagern sich ab, durch Proliferation und Bildung einer extrazellulären Matrix findet eine Vernarbung statt. Somit scheint die Überaktivierung des natürlichen Immunsystems (Komplement und Makrophagen) eine zentrale Rolle bei der Atherosklerose zu spielen (Bhakdi et al. 2002).

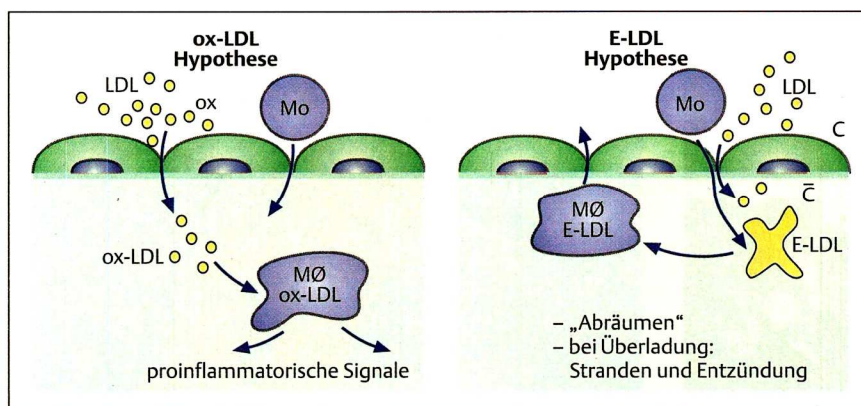


Abbildung 90: Gegenüberstellung der herkömmlichen Oxidationstheorie (links) und der Mainzer Hypothese (rechts): Oxidationstheorie: LDL wird vor oder während der transendothelialen Passage oxidiert, wirkt proinflammatorisch und induziert Schaumzellbildung. Mainzer Hypothese: LDL erreicht hauptsächlich in Nativform das Subendothelium. Dort geschieht ein enzymatischer Ab- und Umbau, sodass ein CRP-bindendes, komplementaktivierendes Lipoprotein (e-LDL) entsteht, das im ungünstigen Fall den pathologischen Prozess der Atherosklerose auslöst (Bhakdi et al. 2002).

## 5.6 Atorvastatin

Statine sind HMG-CoA-Reduktase-Hemmer. Diese Reduktase katalysiert einen frühen und limitierenden Schritt in der Cholesterol-Biosynthese. Die Hauptwirkung der Statine liegt in der Senkung des LDL-Cholesterols. Klinische und pathologische Studien zeigen, dass erhöhte Plasmakonzentrationen an Cholesterol, LDL-Cholesterol und Apolipoprotein B eine Atherosklerose verstärken und das Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen erhöht. Vermehrte Anteile an HDL-Cholesterol (HDL = „high density lipoprotein“) verringern dieses Risiko. Die-

ser Zusammenhang wird in der Studie aus einer schwedischen Arbeitsgruppe um Olsson et al. (2002) bestätigt. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom reduzierte eine lipidsenkende Therapie mit hochdosiertem Atorvastatin kurzfristig wiederkehrende ischämische Effekte (Olsson et al. 2002).

Auch die Ergebnisse aus den vorliegenden Untersuchungen sprechen für die Fähigkeit der Statine, inflammatorische Antworten zu reduzieren. Die Rezeptoren CD14 und CD16 zeigten als Reaktion auf Atorvastatin eine abfallende Expression. Bei LPS stimulierten Monozyten kam es zu keinem eindeutigen Ergebnis. Statine bewirkten bei HLA-DR in vitro ebenfalls einen verminderten Effekt auf die Expression stimulierter Monozyten. Die abfallende HLA-DR-Expression unter LPS-Einfluss wird verstärkt. Bei unstimulierten Monozyten bewirkte Atorvastatin einen synergistischen Effekt auf das Ansteigen der HLA-DR-Expression.

Unabhängig von der lipidsenkenden Wirkung der Statine gibt es weitere klinische Ergebnisse bezüglich dieser Substanzgruppe. So therapierten Bianchi et al. eine Gruppe von Patienten mit Nierenerkrankungen für die Dauer eines Jahres mit Atorvastatin. Am Ende dieses Intervalls wurde eine Verringerung des Proteinverlustes festgestellt. Die Nierenfunktion, bestimmt durch Kreatinin-Clearance, war stabil. Bei einer Vergleichsgruppe war der Proteinverlust unverändert und die Kreatinin-Clearance gefallen (Bianchi et al. 2003). Demzufolge hat die lipidsenkende Therapie einen protektiven Effekt auf die Nierenfunktion. Bei einer Studie an Patienten mit Koronarinsuffizienz konnte durch den Einsatz von Atorvastatin die Mortalität und der Anteil der Infarkte gesenkt werden (Athysos et al. 2002). Auch die Nierenfunktion der Patienten der genannten Untersuchung wurde evaluiert. Atorvastatin-behandelte Patienten wiesen eine deutlich erhöhte Kreatinin-Clearance auf. Bei anderen Statinen war der Effekt geringer, bei der Gruppe ohne Statine kam es sogar zu einem Abfall der Kreatinin-Clearance.

Im vorliegenden Versuch verminderte sich die TLR2-Expression unstimulierter Monozyten durch Atorvastatin nach 24 Stunden, während für den TLR4-Rezeptor unstimulierter Monozyten kein eindeutiges Ergebnis dargestellt werden konnte. Dagegen kommt es bei LPS-stimulierten Monozyten zu einer geringfügigen erhöhten Rezeptorexpression sowohl von TLR2 als auch von TLR4.

Die Befunde waren für uns jedoch nicht endgültig beurteilbar, da ein Einfluss der Trägersubstanz für die Lösung des Statins auf die Immunphänotypie der Zellen nicht auszuschließen war.

## 5.7 Vitamin D

Die soweit bekannten nicht-kalzämischen Wirkungen von Vitamin D erstrecken sich auf verschiedene Zellgruppen. Bei aktivierten Lymphozyten hemmt Vitamin D beispielsweise die Proliferation sowie die Synthese von IL-2, IFN und Antikörpern. Bei neoplastischen Zellen im Rahmen der Tumorgenese bewirkt Vitamin D ebenfalls eine Proliferationshemmung. Antigenpräsentierende Zellen besitzen auch Vitamin D-Rezeptoren sowie eine 1-Alpha-Hydroxylase zur eigenen Synthese von Vitamin D. Welche Reaktionen auf Vitamin D-Derivate als potentiell immunmodulatorische Substanzen sind also zu erwarten?

Die Ergebnisse zeigen deutlich die immunmodulatorischen Fähigkeiten dieser Substanzen. 1-Alpha-Calcidol und Calcitriol erhöhten die monozytäre Expression sowohl von CD14 unstimulierter als auch Endotoxin-stimulierter Zellen. LPS und Vitamin D-Derivate interagierten synergistisch. Die CD16-Expression unstimulierter als auch stimulierter Monozyten erhöhte sich durch 1-alpha-Calcidol und Calcitriol ebenfalls (Tabelle 20). Calcidol vermehrte die CD14-Expression in unstimulierten und in LPS-aktivierten, kultivierten Monozyten offensichtlich durch den gleichen oder einen ähnlichen Rezeptor wie den, der für 1-25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> gezeigt wurde (Wang et al. 2004).

Bei Dialysepatienten ist infolge einer chronischen LPS-Exposition und erhöhtem Zellumsatz eine verringerte zelluläre Reaktivität in Bezug auf Endotoxin vorhanden, d.h. CD14 und CD16 werden heruntergeregelt. Möglicherweise können Vitamin D-Derivate wie Calcitriol und 1-Alpha-Calcidol diesen Defekt bis zu einem gewissen Maße ausgleichen. Auch nach Tokuda et al. zeigen Monozyten von Patienten mit beeinträchtigter Nierenfunktion ohne Vitamin D-Ergänzung eine signifikant reduzierte Expression von CD14 (Tokuda et al. 2000).

Vitamin D-Derivate regulierten die Expression von HLA-DR drastisch nach unten, ähnlich wie in Monozytenkulturen nach der Inkubation mit LPS oder bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen beobachtet (Tabelle 20). Diese Hemmung von HLA-DR durch mikrobielle Liganden ist äquivalent zum Status relativer Immunsuppression und einer Reaktionslosigkeit antigenpräsentierender Zellen. Somit ahmte 1-Alpha-Calcidol den biologischen Effekt von Endotoxin oder immunsuppressiven Agenzien nach. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass eine tägliche Dosis von 0,5 µg Alphacalcidol bei einer Gruppe von 162 hämodialysierten Patienten mit reduziertem Risiko eines kardiovaskulären Todes im Vergleich zu 80 Nicht-Nutzern assoziiert war (Shoji et al, 2004). Somit bestätigen diese Ergebnisse eine frühere Studie, in der Calcitriol (1-25-Vit D<sub>3</sub>) in einer Dosierung von 2 µg intravenös anämische Zustände verbesserte und den Bedarf an Erythropoietin bei Hämodialysepatienten verringerte (Goicoechea et al, 1998). Die potente Hemmung der HLA-Expression durch



LPS wird durch Alphacalcidol und auch durch Calcitriol zusätzlich verstärkt. Zusätzlich reduzierte Calcidol die TLR2-Expression unstimulierter Monozyten (Tabelle 20). Da nach Muta et al. CD14 ein Korezeptor für TLR2 als auch für TLR4 ist, kann unter diesen Umständen ein negativer Feedback für TLR2 vermutet werden (Muta et al. 2001). Die eigenen Ergebnisse unterstützen die Ansicht, dass nicht nur mikrobielle Komponenten mit Toll-like Rezeptoren interagieren. Somit kann neben gramnegativen Bakterien, Hitzeschockprotein-70 und Komponenten der extrazellulären Matrix auch 1-Hydroxy-Vitamin D3 TLR2 modulieren. Auf den TLR4-Phänotyp zeigten Vitamin D-Derivate keinen eindeutigen Einfluss.

Tabelle 20: Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Rezeptoren (CD14, CD16, HLA-DR, TLR2, TLR4) unter dem Einfluss von Vitamin D. (Anzahl der Pfeile verweist auf Intensität der Expressionsveränderung; 48h und 72h: Zeitpunkt der Messung nach Kulturbeginn, ~~~~~: kein eindeutiges Ergebnis)

<b>CD14 und CD16</b>	<b>LPS</b> →	↑ ↑ ↑
<b>CD14 und CD16</b>	<b>Vitamin D mit &amp; ohne LPS</b> →	↑ ↑ ↑
<b>HLA-DR</b>	<b>LPS</b> →	↓ ↓ ↓ ↓
<b>HLA-DR</b>	<b>Vitamin D mit &amp; ohne LPS</b> →	↓ ↓ ↓ ↓ ↓
<b>TLR2 und TLR4</b>	<b>LPS</b> →	↑ (48h) ↓ (72h)
<b>TLR2</b>	<b>Vitamin D mit &amp; ohne LPS</b> →	↓
<b>TLR4</b>	<b>Vitamin D mit &amp; ohne LPS</b> →	~~~~~

In einer zeitgleich durchgeführten Untersuchung am selbigen Institut untersuchten Lambert et al. den Einfluss von Paracalcitol (PA, 19-nor-1- $\alpha$ -25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D<sub>2</sub>) auf die Rezeptorexpression peripherer Blutmonozyten unter Kulturbedingungen sowie bei Patienten nach Dialyse und anschließender PA-Injektion. Die untersuchten Rezeptoren kultivierter Monozyten reagierten ähnlich wie bei Alphacalcidol und Calcitriol: CD14 wurde vermehrt, HLA-DR und TLR2 vermindert exprimiert. Im Unterschied zu Alphacalcidol und Calcitriol zeigte Paracalcitol auch auf TLR4 Einfluss und verursachte eine verminderte Expression. Die Ergebnisse bei den Patienten bestätigen diese Effekte, wobei PA jedoch keinen Effekt auf TLR4 zeigte. Zusätzlich untersuchte intrazelluläre Toll-like Rezeptoren 2 und 4 reagierten nicht auf PA unter Kulturbedingungen. Die Expression des intrazellulären Toll-like Rezeptors 4 im Blut von Patienten unter PA-Behandlung nahm jedoch ab (Lambert et al. 2008).

## 5.8 Xanthinderivate

Pentoxifyllin ist ein Phosphodiesterasehemmer mit Wirkung auf die zellulären Blutbestandteile, die Blutviskosität und die glatten Muskelfasern der Gefäßwand (Vasodilatation). Die Sub-

stanz verbessert die Verformbarkeit der Erythrozyten und vermindert die Thrombozytenaggregation. Dadurch verbessert sich die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und die Mikrozirkulation. Eine Abnahme durchschnittlicher Fibrinogenkonzentration und ein Anstieg des Antithrombin III-Spiegels sind weitere, die Viskosität vermindern, Effekte. Im Tiernmodell hemmt Pentoxifyllin die Adhäsivität von Leukozyten am Gefäßendothel und die Leukozytenaktivierung. Dies vermindert die Produktion und Aktivierung proinflammatorischer Zytokine und dadurch bedingte Endothelschäden in vivo und in vitro. In vitro hemmt Pentoxifyllin die monozytäre Produktion von TNF- $\alpha$  und die T-Zell-Produktion von IFN- $\gamma$ . In Kombination mit Kortikosteroiden zeigte Pentoxifyllin bei Patienten mit pulmonaler Sarkoidose einen synergistischen immunsuppressiven Effekt. Die Sarkoidose ist eine systemische, granulomatöse Erkrankung unbekannter Ätiologie mit verstärkter zellulärer Immunaktivität in den betroffenen Organen. Mit Pentoxifyllin allein als auch in Kombination mit Kortikosteroiden behandelte Patienten zeigten eine signifikante Verbesserung (Fazzi 2003).

Interessanterweise fand sich im Zusammenhang mit granulomatösen Erkrankungen wie beispielsweise der Sarkoidose eine erhöhte extrarenale Bildung von Calcitriol. Vitamin D-Derivate zeigten in den vorliegenden in vitro-Versuchen deutliche immunmodulatorische Eigenschaften, die sich für HLA-DR, TLR2 und TLR4 tendenziell auch für Pentoxifyllin nachweisen ließen. So regulierte Pentoxifyllin die HLA-DR-Expression nach unten und ahmte somit wie Vitamin D-Derivate den biologischen Effekt von Endotoxin oder immunsuppressiven Agenzien nach. Auch die Expression des TLR2 und TLR4-Rezeptors verminderte sich in höherer Dosierung. Allerdings hemmte die Substanz in höheren Dosierungen im Gegensatz zu Vitamin D-Derivaten bei LPS-stimulierten Monozyten sowohl die Expression des CD14- als auch des CD16-Rezeptors (Tabelle 21).

Tabelle 21: Überblick über die Ergebnisse der untersuchten Rezeptoren (CD14, CD16, HLA-DR, TLR2, TLR4) unter dem Einfluss von Pentoxifyllin. (Anzahl der Pfeile verweist auf Intensität der Expressionsveränderung)

<b>CD14 und CD16</b>	<b>LPS</b> →	↑ ↑ ↑
<b>CD14 und CD16</b>	<b>Pentoxifyllin mit LPS</b> →	↓
<b>HLA-DR</b>	<b>Pentoxifyllin mit &amp; ohne LPS</b> →	↓ ↓
<b>TLR2 und TLR4</b>	<b>Pentoxifyllin mit &amp; ohne LPS</b> → <b>↓ bei höherer Dosierung</b>	

Den antiinflammatorischen Hintergrund von Pentoxifyllin bestätigt auch eine Studie von Cooper et al., in der Pentoxifyllin bei Patienten mit Erythropoietin-resistenter Anämie die Hämoglobinproduktion verbesserte (Cooper et al. 2004). Eine Hemmung proinflammatorischer Zytokinproduktion ermöglicht im Organismus eine verstärkte Erythropoese. Nach Van Duin

et al. hatte die prophylaktische Gabe von Pentoxifyllin bei mit LPS behandelten Zwergziegen allerdings keinen hemmenden Einfluss auf die Akute-Phase-Reaktion (Van Duin et al. 1995).

Eingesetzt wird Pentoxifyllin vor allem zur Behandlung peripherer, aber auch zerebraler Durchblutungsstörungen. Eine das Zentralnervensystem stimulierende Wirkung, wie sie von anderen Methylxanthinen bekannt ist, besitzt Pentoxifyllin nicht.

## 6 Zusammenfassung

Die erhaltenen Befunde belegen zusammenfassend die tragende Rolle monozytärer Antigene wie CD14, CD16, HLA-DR, TLR2 und TLR4. Sowohl im zeitlichen Verlauf als auch unter dem Einfluss verschiedener Substanzen zeigten die untersuchten Rezeptoren charakteristische Veränderungen:

### *Allgemeine Analysen:*

- a. Die monozytäre Expression von CD14 sowie von CD16 stieg im Verlauf der Zellkultur langsam an.
- b. Der Kontakt mit LPS erhöhte deutlich die Expression von CD14 und CD16 gegenüber unstimulierten Monozyten.
- c. Bei unstimulierten Monozyten stieg die Expression von HLA-DR während der Dauer der Zellkulturzeit kontinuierlich und deutlich an.
- d. LPS hemmte die Expression von HLA-DR. Ein deutlich zu beobachtendes Sinken der Rezeptorexpression im Vergleich zu unstimulierten Monozyten war die Folge.
- e. Charakteristisch für die Rezeptoren TLR2 und TLR4 war der Anstieg der Expression im zeitlichen Verlauf bis zu dem Messzeitpunkt nach 48 Stunden mit anschließendem Sinken der Expression.
- f. LPS übte auf TLR2 einen deutlichen Einfluss aus: die Expression sank.
- g. TLR4 reagierte am Anfang der Kulturzeit kaum auf LPS. Zum Messzeitpunkt nach 72 Stunden sank die Expression.

### *Erythropoietin:*

- a. Die Expression von CD14 und CD16 verminderte sich in der Gegenwart von Epoetin alpha.
- b. Dieser Effekt blieb bei mit Endotoxin-stimulierten Monozyten erhalten.
- c. Epoetin alpha und LPS interagierten somit antagonistisch, da LPS allein eine Erhöhung der Expression von CD14 und CD16 bewirkte.
- d. Die Expression von HLA-DR erhöhte sich unter dem Einfluss von Epoetin alpha sowohl bei unstimulierten als auch bei mit Endotoxin-stimulierten Monozyten.
- e. Epoetin alpha bewirkte somit bei HLA-DR ebenfalls einen antagonistischen Effekt.

- f. Der Abfall der HLA-DR-Expression konnte bei Vorinkubation mit EPO und anschließender Stimulation mit Endotoxin nicht aufgehalten werden.
- g. Epoetin alpha erhöhte die TLR2- und TLR4-Expression bei unstimulierten und mit LPS stimulierten Monozyten.
- h. Monozyten, die erst nach dem Kontakt mit EPO mit Endotoxin-stimuliert wurden, zeigten einen Abfall der TLR2 und TLR4-Expression.

*Bisphosphonate:*

- a. Der CD14-Rezeptor reagierte auf Ibandronsäure mit einer verminderten Expression sowohl bei unstimulierten als auch bei mit LPS stimulierten Monozyten.
- b. CD16 zeigte nur bei unstimulierten Monozyten einen deutlichen Abfall seiner Expression.
- c. Ibandronsäure und LPS interagierten somit antagonistisch.
- d. Das Ausmaß der Expressionsänderung war in niedrigerer Dosierung ausgeprägter.
- e. CD16, HLA-DR und TLR2 reagierten bei mit Endotoxin-stimulierten Monozyten mit nur geringfügigen und nicht eindeutigen Änderungen in ihrer Expression.
- f. Bei unstimulierten Monozyten fiel die Expression von HLA-DR und TLR2 nach einem anfänglichen Anstieg nach 48 Stunden ab.
- g. Der TLR4-Rezeptor reagierte insgesamt mit einer geringgradigen Erhöhung der Expression.

*Glucocorticoide:*

- a. In Gegenwart von Prednisolon kam es zu einer Verminderung der Expression des CD14- und CD16-Rezeptors.
- b. Dieser Effekt wurde auch bei mit Endotoxin-stimulierten Monozyten beobachtet.
- c. Prednisolon und LPS interagierten somit antagonistisch.
- d. Bei HLA-DR bewirkte Prednisolon einen ebenfalls vermindernenden Effekt auf die Expression. Das Absinken der Expression von HLA-DR wurde verstärkt.
- e. Für TLR2 zeigte sich unter dem Einfluss von Prednisolon auf unstimulierte Monozyten eine vermehrte Expression.
- f. Der gleiche Effekt, eine Erhöhung der TLR2-Expression, war auch bei stimulierten Monozyten zu beobachten.

- g. Prednisolon erhöhte die TLR4-Expression bei unstimulierten Monozyten, während die Expression bei stimulierten Zellen vermindert war.

### *Atorvastatin:*

- a. Die Rezeptoren CD14 und CD16 zeigten als Reaktion auf Atorvastatin eine Reduzierung ihrer Expression.
- b. Bei mit LPS stimulierten Monozyten kam es für den CD14- und CD16-Rezeptor zu keinem eindeutigen Ergebnis.
- c. Bei unstimulierten Monozyten hatte Atorvastatin einen synergistischen Effekt auf das Ansteigen der HLA-DR-Expression.
- d. Bei stimulierten Monozyten hatte Atorvastatin einen synergistischen Effekt auf das Absinken der HLA-DR-Expression.
- e. Die Expression von TLR2 war durch Atorvastatin bei unstimulierten Monozyten nach 24 Stunden vermindert, während es bei mit Endotoxin-stimulierten Monozyten zu einer geringfügigen Erhöhung der Rezeptorexpression von TLR2 kam.
- f. Für den TLR4-Rezeptor gab es kein eindeutiges Ergebnis bei unstimulierten Monozyten. Im Gegensatz dazu kam es auch für den TLR4-Rezeptor zu einem Anstieg der Expression nach Kontakt der Monozyten mit LPS.

### *LDL, e-LDL:*

- a. Nach sechsständiger Inkubation der Monozyten mit e-LDL wurde im Transmissions-elektronenmikroskop ein Einschluss von Fettpartikeln in die Zellen nachgewiesen. Diese Einschlüsse waren bei mit LDL inkubierten Monozyten nicht zu finden.
- b. Sowohl bei e-LDL als auch bei LDL-inkubierten Monozyten wurden in Apoptose befindliche Zellen gefunden.
- c. HLA-DR als auch TLR2- und TLR4-Rezeptor reagierten teilweise auf das enzymatisch veränderte Lipoprotein mit einer deutlichen bis extremen Erhöhung der Expression.
- d. Bei Kontakt unstimulierter Monozyten mit LDL bzw. e-LDL und Atorvastatin kam es zu einem Abfall der Expression aller untersuchten Rezeptoren: CD14, CD16, HLA-DR, TLR2, TLR4.

*Vitamin D:*

- a. 1-Alpha-Calcidol und Calcitriol erhöhten sowohl die monozytäre Expression von CD14 und CD16 bei unstimulierten als auch bei mit Endotoxin-stimulierten Zellen.
- b. LPS und Vitamin D-Derivate interagierten synergistisch.
- c. Vitamin D-Derivate regulierten die Expression von HLA-DR drastisch nach unten.
- d. Zusätzlich reduzierten Vitamin D-Derivate die TLR2-Expression sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Monozyten.
- e. Auf den TLR4-Phänotyp zeigten Vitamin D-Derivate keinen eindeutigen Einfluss.

*Xanthinderivate:*

- a. Pentoxifyllin hemmte in höheren Dosierungen v.a. bei mit LPS stimulierten Monozyten sowohl die Expression des CD14- als auch des CD16-Rezeptors.
- b. Pentoxifyllin regulierte die Expression von HLA-DR nach unten.
- c. Die Expression des TLR2- und TLR4-Rezeptors wurde in höherer Dosierung vermindert.
- d. Für den TLR2- und TLR4-Rezeptor unstimulierter und stimulierter Monozyten galt: vermehrte Expression bei niedrigerer Dosierung, verminderte Expression bei höherer Dosierung.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, über die bekannten Wirkungen der untersuchten Pharmaka hinausgehend mögliche immunmodulatorische Effekte zu prüfen. Monozyten-assoziierte Antigene wie TLR2, TLR4, CD14, CD16 und HLA-DR können im Rahmen des angeborenen Immunsystems schnell und effektiv auf Pathogene reagieren. Sie funktionieren als „pattern recognition receptors“ (PRRs) in Säugetieren und dem Menschen und sind in der Lage, nur bei mikrobiellen Pathogenen vorkommende Muster zu erkennen („pathogen associated molecular pattern“, PAMPs).

Die vorliegenden Befunde sind geeignet, auch unter klinischen Bedingungen die Genese von Erkrankungen besser beurteilen zu helfen. Mehrfach wiederholte Versuchsansätze ergeben eine hohe Aussagekraft der Ergebnisse. Auf diesem Weg lassen sich spezifische Rezeptoreigenschaften erarbeiten, die mit Daten aus der Praxis ergänzt und verknüpft werden müssen. Das Wissen um Expressionsveränderungen von Monozytenantigenen kommt bereits als Verlaufskontrolle bei auftretenden Infektionen bei Patienten zur Anwendung. Weiterführende Forschung über das Verständnis der Rezeptorfunktionen hinaus wird diverse Einsatzmöglichkeiten v.a. TLR-modulierender Agentien zur therapeutischen Applikation schaffen.

## 7 Summary

### **Expression of monocytic antigens under the influence of various pharmaceuticals and lipoproteins: in vitro analyses of CD14 (endotoxin receptor), CD16 (Fc-gamma-III receptor), HLA-DR and Toll-like receptor 2 and 4 (TLR2, TLR4)**

The achieved findings prove the important role of monocyte antigens like CD14, CD16, HLA-DR, TLR and TLR4. During the period of cell culture and under the influence of different substances the examined receptors showed characteristic shifts:

#### General analysis:

- a. Monocyte expression of CD14 and CD16 increased slowly during the period of cell culture.
- b. Exposure to bacterial Lipopolysaccharid obviously increased the expression of CD14 and CD16 compared to monocytes without LPS.
- c. In monocytes without exposure to LPS the expression of the HLA-DR antigen increased during the period of cell culture continuously and obviously.
- d. LPS inhibited the expression of the HLA-DR antigen. As a result the obvious decrease of expression could be observed compared to unstimulated monocytes.
- e. TLR2 and TLR4: increase of expression during the period of cell culture up to 48 hours followed by a decrease was characteristically.
- f. LPS exerted clear influence on TLR2: the expression decreased.
- g. TLR4 barely responded to LPS at the beginning of cell culture. After 72 hours the expression decreased.

#### Erythropoietin:

- a. The monocyte expression of CD14 and CD16 decreased after exposure to Epoetin alpha.
- b. This effect remained on monocytes stimulated with endotoxin.
- c. Therefore Epoetin alpha and LPS interacted antagonistically, as LPS alone caused increased expression of CD14 and CD16.
- d. HLA-DR expression increased under influence of Epoetin alpha on monocytes with and without exposure to LPS.
- e. Thus Epoetin alpha caused an antagonistic effect on HLA-DR too.
- f. The decrease of HLA-DR expression could not be stopped through preincubation with EPO followed by exposure to LPS.



- g. Epoetin alpha increased TLR2 and TLR4 expression on monocytes with and without exposure to LPS.
- h. Monocytes with EPO preincubation followed by LPS exposure reacted with decreased TLR2 and TLR4 expression.

Bisphosphonate:

- a. CD14 receptor responded to Ibandronate with decreased monocytic expression with and without exposure to LPS.
- b. CD16 expression was obviously decreased only on monocytes without LPS.
- c. Therefore Ibandronate and LPS interacted antagonistically.
- d. The change in expression was more pronounced in lower dosage.
- e. CD16, HLA-DR and TLR2 reacted on monocytes exposed to LPS with minor and not explicit changes in their expression.
- f. After initial increase on monocytes without exposure to LPS the HLA-DR and TLR2 expression decreased after 48 hours.
- g. TLR4 responded overall with a minor increase of expression.

Prednisolone:

- a. The presence of Prednisolone resulted in a decrease of CD14 and CD16 expression.
- b. This effect remained on monocytes stimulated with endotoxin.
- c. Therefore Epoetin alpha and LPS interacted in an antagonistic way.
- d. On the HLA-DR antigen Prednisolone caused a decreasing effect also. The decrease of HLA-DR expression was aggravated.
- e. TLR2 under influence of Prednisolone showed increased expression on monocytes without exposure to LPS.
- f. The same effect, an increase of TLR2 expression, was seen on monocytes with exposure to LPS.
- g. Prednisolone increased TLR4 expression on monocytes without exposure to LPS, whereas the expression on monocytes with exposure to LPS was decreased.

Atorvastatine:

- a. CD14 and CD16 receptor showed a decrease in their expression as a reaction to Atorvastatine.
- b. On monocytes with exposure to LPS no obvious result for CD14 and CD16 receptor could be seen.
- c. Atorvastatine had a synergistic effect on the increase of HLA-DR expression on monocytes without exposure to LPS.

- d. Atorvastatine had a synergistic effect on the decrease of HLA-DR expression on monocytes with exposure to LPS.
- e. Atorvastatine decreased TLR2 expression after 24 hours on monocytes without exposure to LPS, whereas on monocytes with exposure to LPS a minor increase of TLR2 expression could be seen.
- f. No obvious result could be found for TLR4 receptor on monocytes without exposure to LPS. On the contrary a increase of TLR4 expression could be observed on monocytes with exposure to LPS.

### LDL, e-LDL:

- a. After six hours of incubation with e-LDL a monocytic embedding of lipid particles was detected through transmission electron microscope.
- b. Apoptotic monocytes were found after incubation with e-LDL and LDL.
- c. Both HLA-DR, TLR2 and TLR4 receptor partially reacted to the enzymatic modified Lipoprotein in some cases with an extreme increase in their expression.
- d. Exposure to LDL respectively e-LDL and Atorvastatine on monocytes without LPS implicated a decrease of expression of all examined receptors: CD14, CD16, HLA-DR, TLR2, TLR4.

### Vitamin D:

- a. 1-Alpha-Calciol and Calcitriol enhanced CD14 and CD16 expression on monocytes with and without exposure to LPS.
- b. LPS and Vitamin D derivatives interacted synergistically.
- c. Vitamin D derivatives downregulated monocytic HLA-DR antigen expression dramatically.
- d. Vitamin D derivatives reduced monocytic TLR2 expression without and with exposure to LPS.
- e. The TLR4 receptor did not react clearly to Vitamin D derivatives.

### Xanthinderivatives:

- a. Pentoxifylline inhibited CD14 and CD16 expression especially on monocytes after exposure to LPS in a dose-dependent manner.
- b. Pentoxifylline downregulated monocytic HLA-DR antigen expression.
- c. Expression of the TLR2 and TLR4 receptor was reduced by increasing dosage of Pentoxifylline.
- d. In monocytic TLR2 and TLR4 receptor expression without as well as with exposure to LPS following reaction could be seen: increased expression with lower dosage, decreased expression with higher dosage.

One goal of the present thesis was to analyze possible immunomodulatory effects beyond the known pharmacological effects of the examined substances. Monocyte associated antigens like TLR2, TLR4, CD14, CD16 and HLA-DR as part of the congenital immune system are able to react quickly and effective to pathogens. They work as “pattern recognition receptors” (PRRs) in mammals and humans and have the ability to recognize “pathogen associated molecular patterns” (PAMPs).

The present findings are appropriate to assess the genesis of diseases under clinical conditions. Repeated experiments supply a high significance of the results. Therefore specific receptor characteristics can be developed, which have to be completed and connected with clinical data. The knowledge of defined changes in monocytic antigen expression is already used for clinical monitoring of patients with infection. Continuing research about the understanding of receptor function will create diverse prospects for the use especially of TLR-modulating agents for therapeutically application.

## 8 Literaturverzeichnis

- AFZALI, B., HAYDAR, A.A., VINEN, K., GOLDSMITH, D.J.,  
Beneficial effects of statins on the kidney: the evidence moves from mouse to man.  
Nephrol Dial Transplant 19:1032-1036 (2004)
- AKIRA, S., TAKEDA, K.,  
Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.  
Nat Immunol 2(8):675-680 (2001)
- AKIRA, S., HEMMI, H.,  
Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family.  
Immunol Lett 85(2):85-95 (2003)
- ALAM, R., ANDERS, H.J.,  
The role of innate immunity in autoimmune tissue injury.  
Curr Opin Rheumatol 20(5):538-544 (2008)
- ALIPRANTIS, A.O., YANG, R.B., MARK, M.R., SUGGETT, S., DEVAUX, B., RADOLF, J.D.,  
KLIMPEL, G.R., GODOWSKY, P., ZYCHLINSKY, A.,  
Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor 2.  
Science 285(5428):736-739 (1999)
- ALIPRANTIS, A.O., YANG, R.B., WEISS, D.S., GODOWSKY, P., ZYCHLINSKY, A.,  
The apoptotic signalling pathway activated by Toll-like receptor 2.  
EMBO J 19(13):3325-3336 (2000)
- ANDERS, H.J., SCHLOENDORFF, D.,  
Toll-like receptors: emerging concepts in kidney disease.  
Curr Opin Nephrol Hypertens 16(3):177-183 (2007)
- ANDERS, H.J., ZECHER, D., SCHLOENDORFF, D.,  
Microbial nucleic acids in the pathogenesis of glomerulonephritis.  
Nephrol Ther 2:422-431 (2006)
- ANDERS, H.J., BANAS, B., SCHLOENDORFF, D.,  
Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease.  
J Am Soc Nephrol 15(4):854-867 (2004)
- ANDERSON, K.V.,  
Toll signalling pathways in the innate immune response.  
Curr Opin Immunol 12(1):13-19 (2000)
- ASAHINA, Y., YOSHIOKA, N., KANO, R., MORITOMO, T., HASEGAWA, A.,  
Full-length cDNA cloning of Toll-like receptor 4 in dogs and cats.  
Vet Immunol Immunopathol 15:96(3-4):159-167 (2003)
- ATHYROS, V.G., PAPAGEORGIOU, A.A., MERCOURIS, B.R. et al,  
Treatment with Atorvastatin to the National Cholesterol Educational Program goal versus  
"usual" care in secondary coronary heart disease prevention. The GREek Atorvastatin and  
Coronary-heart-disease Evaluation (GREACE) study.  
Curr Med Res Opin 18:220-228 (2002)

BELGE, K.U., DAYYANI, F., HORELT, A., SIEDLAR, M., FRANKENBERGER, M., FRANKENBERGER, B., ESPEVIK, T., ZIEGLER-HEITBROCK, L.,  
The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF.  
J Immunol 168:3536-3542 (2002)

BHAKDI, S., TORZEWSKI, M., PAPROTKA, K., SCHMITT, S., BARSOOM, H., SURIYAPHOL, P., HAN, S.R., LACKNER, K.J., HUSMANN, M.,  
Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence.  
Circulation 109(15):1870-1876 (2004)

BHAKDI, S.,  
An hypothesis for the immunopathogenesis of atherosclerosis.  
Clin Nephrol 60 Suppl 1:49-52 (2003)

BHAKDI, S.,  
Immunopathogenese der Atherosklerose. Die Mainzer Hypothese.  
Dtsch Med Wochenschr 127:390-394 (2002)

BHAKDI, S., DORWEILER, B., KIRCHMANN, R., TORZEWSKI, J., WEISE, E., TRANUM-JENSEN, J., WALEV, I., WIELAND, E.,  
On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety.  
J Exp Med 182(6):1959-1971 (1995)

BIANCHI, S., BIGAZZI, R., CAIAZZA, A. et al,  
A controlled prospective study of the effects of Atorvastatin on proteinuria and progression of kidney disease.  
Am J Kidney Dis 41:565-570 (2003)

BOISSIER, S., MAGNETTO, S., FRAPPART, L., CUZIN, B., EBETINO, F.H., DELMAS, P.D., CLEZARDIN, P.,  
Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices.  
Cancer Res 57(18):3890-3894 (1997)

BOYUM, A.,  
Isolation of Lymphocytes, Granulocytes and Macrophages.  
Scand J Immun Suppl 5:9-16 (1976)

BOYUM, A.,  
Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media.  
Methods Enzymol 108:88-102 (1984)

BORNSTEIN, S.R., BRIEGEL, J.,  
A new role for glucocorticoids in septic shock.  
Am J Respir Crit Care Med 167:485-486 (2003)

BRENNAN, C.A., ANDERSON, K.V.,  
Drosophila: the genetics of innate immune recognition and response.  
Annu Rev Immunol. 22:457-483 (2004)

BRYL, E., MYSLIWSKA, J., DEBSKA-SLIZIEN, A., RACHON, D., BULLO, B., LIZAKOWSKI, S., MYSLIWSKI, A., RUTKOWSKI, B.,  
The influence of recombinant human erythropoietin on tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 production by whole blood cell cultures in hemodialysis patients.  
Artif Organs 22(3):177-181 (1998)

CALVILLO, L., LATINI, R., KAJSTURA, J., LERI, A., ANVERSA, P., GHEZZI, P., SALIO, M., CERAMI, A., BRINES, M.,  
Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodelling.  
Proc Natl Acad Sci USA 100(8):4802-4806 (2003)

CAMPOS, M.A., ALMEIDA, I.C.; TAKEUCHI, O., AKIRA, S., VALENTE, E.P., PROCIOPO, D.O., TRAVASSOS, L.R., SMITH, J.A., GOLENBOCK, D.T., GAZZINELLI, R.T.,  
Activation of Toll-like receptor 2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite.  
J Immunol 167(1):416-423 (2001)

CASELLA, C.R., MITCHELL, T.C.,  
Putting endotoxin to work for us: Monophosphoryl Lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant.  
Cell Mol Life Sci, 65(20):3231-3240 (2008)

CHEN, Y.M., NG, Y.Y., LIN, S.L., CHIANG, W.C., LAN, H.Y., TSAI, T.J.,  
Pentoxifylline suppresses renal tumour necrosis factor alpha and ameliorates experimental crescentic glomerulonephritis in rats.  
Nephrol Dial Transplant 19(5):1106-1115 (2004)

COBAN, C., ISHII, K.J., KAWAI, T., HEMMI, H., SATO, S., UEMATSU, S., YAMAMOTO, M., TAKEUCHI, O., ITAGAKI, S., HORII, T., AKIRA, S.,  
Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin.  
J Exp Med 3;201(1):19-25 (2005)

COOPER, A., MIKHAIL, A., LETHBRIDGE, M.W., KEMENY, D.M., MACDOUGALL, I.C.,  
Pentoxifylline improves haemoglobin levels in patients with erythropoietin-resistant anemia in renal failure.  
J Am Soc Nephrol 15:1877-1882 (2004)

CUZZOCREA, S., MAZZON, E., DI PAOLA, R., GENOVESE, T., PATEL, N.S., BRITTI, D., DE MAJO, M., CAPUTI, A.P., THIEMERMANN, C.,  
Erythropoietin reduces the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse.  
Arthritis Rheum 52(3):940-950 (2005)

DAYYANI, F., BELGE, K.U., FRANKENBERGER, M., MACK, M., BERKI, T., ZIEGLER-HEITBROCK, L.,  
Mechanism of glucocorticoid-induced depletion human CD14+CD16+ monocytes.  
J Leukoc Biol 74(1):33-39 (2003)

DRAUDE, G., VON HUNDELSHAUSEN, P., FRANKENBERGER, M., ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L., WEBER, C.,  
Distinct scavenger receptor expression and function in the human CD14(+)/CD16(+) monocyte subset.  
Am J Physiol Heart Circ 276:1144-1149 (1999)

- DU, X., POLTORAK, A., WEI, Y., BEUTLER, B.,  
Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution.  
*Eur Cytokine Netw* 11(3):362-371 (2000)
- DZIARSKI, R., WANG, Q., MIYAKE, K., KIRSCHNING, C.J., GUPTA, D.,  
MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and  
enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their  
cell wall components.  
*J Immunol* 1;166(3):1938-1944 (2001)
- FARMACIOTIS, A., SCHERBERICH, J.E.,  
P264 Toll-like receptor 2 (TLR2) expression of monocytes in kidney allograft dysfunction.  
*Nieren- und Hochdruckkrankh.* 37:522-523 (2008)
- FAZZI, P.,  
Pharmacotherapeutic management of pulmonary sarcoidosis.  
*Am J Respir Med* 2(4):311-320 (2003)
- FINGERLE-ROWSON, G., ANGSTWURM, M., ANDREESEN, R., ZIEGLER-HEITBROCK,  
H.W.L.,  
Selective depletion of CD14+CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy.  
*Clin Exp Immunol* 112:501 (1998)
- FINGERLE-ROWSON, G., AUERS, J., KREUZER, E., FRAUNBERGER, P., BLUMEN-  
STEIN, M., ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L.,  
Expansion of CD14+CD16+ monocytes in critically ill cardiac surgery patients.  
*Inflammation* 22:367 (1998)
- FISCHER, S.F., REHM, M., BAUER, A., HOFLING, F., KIRSCHNEK, S., RUTZ, M., BAUER,  
S., WAGNER, H., HACKER, G.,  
Toll-like receptor 9 signaling can sensitize fibroblasts für apoptosis.  
*Immunol Lett* 15;97(1):115-122 (2005)
- FRENDEUS, B., WACHTLER, C., HEDLUND, M., FISCHER, H., SAMUELSSON, P.,  
SVENSSON, M., SVANBORG, C.,  
*Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation.  
*Mol Microbiol* 40(1):37-51 (2001)
- GHEZZI, P., BRINES, M.,  
Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine.  
*Cell Death Differ* 11 Suppl 1:37-44 (2004)
- GIRLING, J.E., HEDGER, M.P.,  
Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: emerging roles in reproductive  
physiology and pathology.  
*Immunol Cell Biol* 85:481-489 (2007)
- GOICOECHEA, M., VAZQUEZ, M.I., RUIZ, M.A., GOMEZ-CAMPDERA, F. et al.,  
Intravenous calcitriol improves anaemia and reduces the need for erythropoietin in haemodi-  
alysis patients.  
*Nephron* 78,23-27 (1998)

GRASSO, G., SFACTERIA, A., CERAMI, A., BRINES, M.,  
Erythropoietin as a tissue-protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go?  
Neuroscientist 10(2):93-98 (2004)

HANISCH, A.,  
Modulation monozytärer Oberflächenantigene (CD14, CD16, HLA-DR, CD86) unter normalen und pathologischen Bedingungen : Klinische Analysen bei traumatischen und Fieber- / Sepsispatienten.  
Städt. Klinikum München-Harlaching, Promotion 2003, Medizinische Fakultät der LMU

HANISCH, A., SCHERBERICH, J.E.,  
Klinisch prognostische Wertigkeit monozytärer Oberflächenmarker bei fieberhaften Infekten. Nieren u Hochdruckkrankheiten 31, 404 (2002)  
dto: Modulation of monocyte surface antigens in „fever-patients“: clinical and prognostic value. Kidney Blood Press Res 25; 127-163 (2002)

HASAN, U., CHAFFOIS, C., GAILLARD, C., SAULNIER, V., MERCK, E., TANCREDI, S., GUIET, C., BRIERE, F., VLACH, J., LEBECQUE, S., TRINCHIERI, G., BATES, E.E.,  
Human TLR 10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88.  
J Immunol 1;174(5):2942-2950 (2005)

HAYASHI, F., SMITH, K.D., OSZINSKY, A., HAWN, T.R., YI, E.C., GOODLETT, D.R., ENG, J.K., AKIRA, S., UNDERHILL, D.M., ADEREM, A.,  
The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5.  
Nature 26;410(6832):1099-1103 (2001)

HEMMI, H., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., KAISHO, T., SATO, S., SANJO, H., MATSUMOTO, M., HOSHINO, K., WAGNER, H., TAKEDA, K., AKIRA, S.,  
A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.  
Nature 408(6813):740-745 (2000)

HIRSCHFELD, M., MA, Y., WEISS, J.H., VOGEL, S.N., WEISS, J.J.,  
Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2.  
J Immunol 165(2):618-622 (2000)

HIRSCHFELD, M., KIRSCHNING, C.J., SCHWANDNER, R., WESCHE, H., WEISS, J.H., WOOTEN, R.M., WEISS, J.J.,  
Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2.  
J Immunol 163(5):2382-2386 (1999)

HODGKINSON, C.P., PATEL, K., YE, S.,  
Functional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen.  
Thromb Haemost 100:301-307 (2008)

HOFFMANN, J.A., KAFATOS, F.C., JANEWAY, C.A., EZEKOWITZ, R.A.,  
Phylogenetic perspectives in innate immunity.  
Science 21; 284(5418):1313-1318 (1999)



- HOMMA, T., KATO, A., HASHIMOTO, N., BATCHELOR, J., YOSHIKAWA, M., IMAI, S., WAKIGUCHI, H., SAITO, H., MATSUMOTO, K.,  
Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells.  
Am J Respir Cell Mol Biol 31(4):463-469 (2004)
- ISHII, K.J., AKIRA, S.,  
Toll-like Receptors and Sepsis.  
Curr Infect Dis Rep 6(5):361-366 (2004)
- ISHII, K.J., UEMATSU, S., AKIRA, S.,  
"Toll" gates for future immunotherapy.  
Curr Pharm Des 12(32):4135-4142 (2006)
- JACOBSON, S.H., HYLANDER, B., THYLEN, P., LUNDAHL, J.,  
Monocyte-related determinants of inflammation in patients on peritoneal dialysis.  
Am J Nephrol 21(1):40-46 (2001)
- JANEWAY, C.A.J.R., MEDZHITOV, R.,  
Innate immune recognition.  
Annu Rev. Immunol 20:197-216 (2002)
- KANCZKOWSKI, W., ZIEGLER, C.G., ZACHAROWSKI, K., BORNSTEIN, S.R.,  
Toll-like receptors in endocrine disease and diabetes.  
Neuroimmun 15:54-60 (2008)
- KAWANAKA, N., NAGAKE, J., YAMAMURA, M., MAKINO, H.,  
Expression of FC  $\gamma$  receptor III (CD16) on monocytes during hemodialysis in patients with chronic renal failure.  
Nephron 90:64-71 (2002)
- KEH, D., BOEHNKE, T., WEBER-CARTENS, S., SCHULZ, C., AHLERS, O., BERCKER, S., VOLK, H.D., DOECKE, W.D., FALKE, K.J., GERLACH, H.,  
Immunologic and hemodynamic effects of „low-dose“ hydrocortisone in septic shock: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study.  
Am J Respir Crit Care Med 167:512-520 (2003)
- KLINKE, R., SILBERNAGL, S.,  
Lehrbuch der Physiologie.  
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1996)
- KUDO, M., AOSAI, F., MUN, H.S., NOROSE, K., AKIRS, S., IWAKURA, Y., YANO, A.,  
The role of IFN-gamma and Toll-like receptors in nephropathy induced by Toxoplasma gondii infection.  
Microbiol Immunol 48(8):617-628 (2004)
- KUNZMANN, V., BAUER, E., FEURLE, J., WEISSINGER, F., TONY, H.P., WILHELM, M.,  
Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma.  
Blood 15;96(2):384-392 (2001)

LAMBERT, K., LIEBSTEIN, B., EGGERER, P., FRANK, H., HARTINGER, A., SCHERBERICH, J.E.,  
P025 Functional antigens (CD14, HLA-DR, TLR2, TLR4) of peripheral blood monocytes during peritoneal dialysis (CAPD) compared to healthy controls.  
Nieren- und Hochdruckkrh. 37,457-458 (2008)

LAMBERT, K., LIEBSTEIN, B., WALCH, A., HARTINGER, A., SCHERBERICH, J.E.,  
P186 19-nor-1- $\alpha$ -25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D<sub>2</sub> modulates CD14, HLA-DR, TLR2, TLR4 expression and ultrastructure of peripheral blood monocytes.  
Nieren- und Hochdruckkrh. 37 501 (2008)

LEE, E.K., KANG, S.M., PAIK, D.J., KIM, J.M., YOUN, J.,  
Essential roles of Toll-like receptor-4 signaling in arthritis induced by type II collagen antibody and LPS.  
Int Immunol 17(3):325-333 (2005)

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J.M., HOFFMANN, J.A.,  
The dorsoventral regulatory gene cassette spaetzle/toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.  
Cell 20;86(6):973-983 (1996)

LE TULZO, Y., PANGAULT, C., AMIOT, L., GUILLOUX, V., TRIBUT, O., ARVIEUX, C., CAMUS, C., FAUCHET, R., THOMAS, R., DRENOU, B.,  
Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by Cortisol during septic shock.  
Am J Respir Crit Care Med 169(10):1144-1151 (2004)

LISSAUER, M.E., JOHNSON, S.B., BOCHICCHIO, G.V., FIELD, C.J., CROSS, A.S., HASDAY, J.D., WHITEFORD, C.C., NUSSBAUMER, W.A., TOWNS, M., SCALEA, T.M.,  
Differential expression of Toll-like receptor genes: sepsis compared to sterile inflammation one day prior to sepsis diagnosis.  
Shock , Online-Version, Preprint (2008)

MEANS, T.K., WANG, S., LIEN, E., YOSHIMURA, A., GOLENBOCK, D.T., FENTON, M.J.,  
Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*.  
J Immunol 163(7):3920-3927 (1999)

MEDZHITOV, R., PRESTON-HULBURT, P., JANEWAY, C.A. J.R.,  
A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.  
Nature 388(6640):323-324 (1997)

MENG, G., RUTZ, M., SCHIEMANN, M., METZGER, J., GRABIEC, A., SCHWANDNER, R.,  
Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes.  
J Clin Invest 113:1473-1481 (2004)

MUTA, T., TAKESHIGE, K.,  
Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR) 2 as well as TLR4.  
Eur J Biochem 268:4580-4589 (2001)

NOCKHER, W.A., WIEMER, J., SCHERBERICH, J.E.,  
Haemodialysis monocytopenia: differential sequestration kinetics of CD14+CD16+ and CD14++ blood monocyte subsets.  
Clin Exp Immunol 123(1):49-55 (2001)

- NOCKHER, W.A., SCHERBERICH, J.E.,  
Expanded CD14+CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing chronic hemodialysis.  
Infect Immunol 66(6):2782-2790 (1998)
- NOCKHER, W.A., SCHERBERICH, J.E.,  
Expression and release of the monocyte LPS receptor antigen CD14 are suppressed by glucocorticoids in vivo and in vitro.  
J Immunol 158:1345-1352 (1997)
- NOCKHER, W.A., SCHERBERICH, J.E.,  
Monocyte cell-surface CD14 expression and soluble CD14 antigen in hemodialysis: evidence for chronic exposure to LPS.  
Kidney Int 48(5):1469-1476 (1995)
- NOCKHER, W.A., BERGMANN, L., SCHERBERICH, J.E.,  
Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients.  
Clin Exp Immunol 98(3):369-374 (1994)
- NOCKHER, W.A., WIGAND, R., SCHOEPPPE, W., SCHERBERICH, J.E.,  
Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus.  
Clin Exp Immunol 96(1):15-19 (1994)
- OHASHI, K., BURKART, V., FLOHE, S., KOLB, H.,  
Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex.  
J Immunol 164:558-561 (2000)
- OKAMURA, Y., WATARI, M., JERUD, E.S., YOUNG, D.W., ISHIZAKA, S.T., ROSE, J., CHOW, J.C., STRAUSS, J.F. 3rd,  
The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4.  
J Biol Chem 276(13):10229-10233 (2001)
- OLSSON, A.G., SCHWARTZ, G.G., JONASSON, L., LINDERFALK, C.,  
Are early clinical effects of cholesterol lowering mediated through effects on inflammation?  
Acta Physiol Scand 176(2):147-150 (2002)
- OZINSKY, A., UNDERHILL, D.M., FONTENOT, J.D., HAJJAR, A.M., SMITH, K.D., WILSON, C.B., SCHROEDER, L., ADEREM, A.,  
The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperations between toll-like receptors.  
Proc Natl Acad Sci 97(25):13766-13771 (2000)
- PARSA, C.J., MATSUMOTO, A., KIM, J. et al.,  
A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart.  
J Clin Invest 112:999-1007 (2003)
- PATOLE, P.S., PAWAR, R.D., LICHTNEKERT, J., LECH, M., KULKARNI, O.P., RAMAN-JANEYULU, A., SEGERER, S., ANDERS, H.J.,  
Coactivation of Toll-like receptor 3 and -7 in immune complex glomerulonephritis.  
J Autoimmun 29(1):52-59 (2007)

PAWAR, R.D., PRASHANT, S.P., ELLWART, A., LECH, M., SEGERER, S., SCHLONDORFF, D., ANDERS, H.J.,

Ligands to nucleic acid-specific toll-like receptors and the onset of lupus nephritis.

J Am Soc Nephrol 17: 3365-3373 (2006)

PECHERSTORFER, M., JILCH, R., SAUTY, A., HORN, E., KECK, A.V., ZIMMER-ROTH, I., THIEBAUD, D.,

Effect of first treatment with aminobisphosphonates pamidronate and ibandronate on circulating lymphocyte subpopulations.

J Bone Miner Res 15(1):147-154 (2000)

RAGNARSDÓTTIR, B., SAMUELSSON, M., GUSTAFSSON, M.C., LEIJONHUFVUD, I., KARPMAN, D., SVANBORG, C.,

Reduced toll-like receptor 4 expression in children with asymptomatic bacteriuria.

J Infect Dis 196(3):475-484 (2007)

ROSSERT, J., ECKHARDT, K.U.,

Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis.

Nephrol Dial Transplant 20:1025-1028 (2005)

SAEMANN, M.D., WEICHARDT, T., ZEYDA, M., STAFFLER, G., SCHUNN, M., STUHLMEIER, K.M., SOBANOV, Y., STULNIG, T.M., AKIRA, S., VON GABAIN, A., VON AHSEN, U., HOERL, W.H. ZLABINGER, G.J.,

Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immunecell activation with adaptive immunity via a toll-like receptor-4-dependent mechanism.

J Clin Invest 115 468-475 (2005)

SALOMAO, R., MARTINS, P.S., BRUNIALTI, M.K.C., FERNANDES, M.L., MARTOS, L.S.W., MENDES, M.E., GOMES, N.E., RIGATO, O.,

TLRsignaling pathway in patients with sepsis.

Shock Vol 30 Suppl 1:73-77 (2008)

SANTUCCI, L., FIORUCCI, S., DI MATTEO, F.M., MORELLI, A.,

Role of tumour necrosis factor alpha release and leukocyte margination in indomethacin-induced gastric injury in rats.

Gastroenterology 108(2):393-401 (1995)

SCHERBERICH, J.E., HARTINGER, A.,

Impact of Toll-like receptor signalling on urinary tract infection.

Int J Antimicrob Agents 31 Suppl 1:9-14 (2008)

SCHERBERICH, J.E.,

Die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren bei Harnwegsinfekten.

Nieren- & Hochdruckkrankh. 37: 9-17 (2008)

SCHERBERICH, J.E., KELLERMAYER, M.A., RIED, C., HARTINGER, A.,

1-Alpha-Calcidol modulates major human monocyte antigens and toll-like receptors TLR2 and TLR4 in vitro.

Eur J Med Res 10(4):179-182 (2005)

SCHERBERICH, J.E., ESTNER, H., SEGERER, W.,

Impact of different immunosuppressive regimens on antigen-presenting blood cells in kidney transplant patients.

Kidney Blood Press Res 27(3):177-180 (2004)

- SCHERBERICH, J.E.,  
Proinflammatory blood monocytes: main effector and target cells in systemic and renal disease; background and therapeutic implications.  
Int J Clin Pharmacol Ther 41(10):459-464 (2003)
- SCHERBERICH, J.E., NOCKHER, W.A.,  
Blood monocyte phenotypes and soluble endotoxin receptor CD14 in systemic inflammatory diseases and patients with chronic renal failure.  
Nephrol Dial Transplant 15(5):574-578 (2000)
- SCHERBERICH, J.E., NOCKHER, W.A. BAER, P.C.,  
Cross-talk between activated tubular epithelia of human kidney and monocytes: a basis for target cell-specific pharmacotherapy?  
Nephrol Dial Transplant 14 Suppl 4:8-10 (1999)
- SCHERBERICH, J.E., NOCKHER, W.A.,  
CD14++ monocytes, CD14+/CD16+ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy.  
Clin Chem Lab Med 37(3):209-213 (1999)
- SCHWANDER, R., DZIARSKY, R., WESCHE, H., ROTHE, M., KIRSCHNING, C.J.,  
Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2.  
J Biol Chem 274(25):17406-17409 (1999)
- SHEU, J.J., CHANG, L.T., CHIANG, C.H., YOUSSEF, A.A., WU, C.J., LEE, F.Y., YIP, H.K.,  
Prognostic value of activated toll-like receptor 4 in monocytes following acute myocardial infarction.  
Int Heart J 49(1):1-11 (2008)
- SHIMAZU, R., AKASHI, S., OGATA, H., NAGAI, Y., FUKUDOME, K., MIYAKE, K., KIMOTO, M.,  
MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.  
J Exp Med 189(11):1777-1782 (1999)
- SHOJI, T., SHINOHARA, K., KIMOTO, E. et al.  
Lower risk for cardiovascular mortality in oral 1-alpha-hydroxyvitamin D3 users in a haemodialysis population.  
Nephrol Dial Transplant 19:179-184 (2004)
- SILVERSTEIN, R., JOHNSON, D.C.,  
Endogenous versus exogenous glucocorticoid responses to experimental bacterial sepsis.  
J Leukoc Biol 73(4):417-427 (2003)
- SMITS, E.L., PONSAERTS, P., BERNEMAN, Z.N., VAN TENDELOO, V.F.,  
The use of TLR7 und TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy.  
The Oncologist 13: Online-Version, Preprint (2008)
- TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., KAWAI, T., SANIO, H., TAKADA, H., OGAWA, T., TAKEDA, K., AKIRA, S.,  
Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components.  
Immunity 11(4):443-451 (1999)

- TOKUDA, N., KANO, M., NOMOTO, K., NAITO, S.,  
Calcitriol therapy modulates the cellular immune response in hemodialysis patients.  
*Am J Nephrol* 20,129-137 (2000)
- TORZEWSKI, M., SURIYAPHOL, P., PAPROTKA, K., SPATH, L., OCHSENHIRT, V.,  
SCHMITT, A., HAN, S.R., HUSMANN, M., GERL, V.B., BHAKDI, S., LACKNER, K.J.,  
Enzymatic modification of low-density lipoprotein in the arterial wall: a new role for plasmin  
and matrix metalloproteinases in atherogenesis.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(11):2130-2136 (2004)
- TRIAL, J., RICE, L.,  
Erythropoietin withdrawal leads to the destruction of young red cells at the endothelial –  
macrophage interface.  
*Current Pharmaceutical Design* 10,183-190 (2004)
- TSUJINO, A., NAKAMURA, T., NISHIURA, Y., SHIRABE, S., FURUYA, T., GOTO, H., KA-  
WAKAMI, A., EGUCHI, K., NAGATAKI, S.,  
Pentoxifylline down-regulates adhesion molecule expression and inflammatory cytokine pro-  
duction in cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV-I-associated  
myelopathy.  
*J Neuroimmunol* 73(1-2):191-196 (1997)
- UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A., HAJJAR, A.M., STEVENS, A., WILSON, C.B., BASSETTI,  
M., ADEREM, A.,  
The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between  
pathogens.  
*Nature* 21;401(6755):811-815 (1999)
- VAN DUIN, C.T., WENSING, T., VAN MIERT, A.S.,  
Pentoxifylline pre-treatment fails to block the acute-phase response to *Escherichia coli* en-  
dotoxin in dwarf goats.  
*Vet Res Commun* 19(2):149-157 (1995)
- VABULAS, R.M., AHMAD-NEJAD, P., DA COSTA, C., MIETHKE, T., KIRSCHNING, C.J.,  
HACKER, H., WAGNER, H.,  
Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR 2) and TLR 4 to activate the  
toll/interleukin-1 receptor signalling pathway in innate immune cells.  
*J Biol Chem* 17;276(33):31332-31339 (2001)
- VABULAS, R.M., WAGNER, H., SCHILD, H.  
Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors.  
*Curr Top Microbiol Immunol* 270:169-184 (2002)
- VILLA, P., BIGINI, P., MENNINI, T., AGNELLO, D., LARAGIONE, T., CAGNOTTO, A., VIVI-  
ANI, B., MARINOVICH, M., CERAMI, A., COLEMAN, T.R., BRINES, M., GHEZZI, P.,  
Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ische-  
mia by targeting neuronal apoptosis.  
*J Exp Med* 198(6):971-975 (2003)
- WANG, J.H., DOYLE, M., MANNING, B.J., DI WU, Q., BLANKSON, S., REDMOND, H.P.,  
Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with suppression of toll-like receptor  
2 expression.  
*J Biol Chem* 277(39):36068-36075 (2002)

- WANG, T.T., NESTEL, F.P., BOURDEAU, V., NAGAI, Y. et al.  
Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression.  
J Immunol 173:2909-2912 (2004)
- WERB, Z., FOLEY, R., MUNCK, A.,  
Interaction of glucocorticoids with macrophages. Identification of glucocorticoid receptors in monocytes and macrophages.  
J Exp Med 147:1684 (1978)
- WILLIAMS, M.J., RODRIGUEZ, A., KIMBRELL, D.A., ELDON, E.D.,  
The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense  
Embo J 16:6120-6130 (1997)
- YAMAMOTO, M., TAKEDA, K., AKIRA, S.,  
TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signalling.  
Mol Immunol 40:861-868 (2004)
- YAROVINKY, F., SHER, A.,  
Toll-like receptor recognition of Toxoplasma gondii.  
Int J Parasitol 36(3):255-259 (2006)
- YOSHIMURA, A., LIEN, E., INGALLS, R.R., TUOMANEN, E., DZIARSKI, R., GOLENBOCK, D.,  
Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2.  
J Immunol 163(1):1-5 (1999)
- ZHANG, D., KIRSCHNING, C.J., MANCINELLI, R., XU, X.P., JIN, Y., FAURE, E.,  
Bacterial Lipopolysaccharid activates nuclear factor-kappa B through interleukin-1 signaling in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes.  
J Biol Chem 271:7611-7614 (1999)
- ZHANG, D., ZHANG, G., HAYDEN, M.S., GREENBLATT, M.B., BUSSEY, C., FLAVELL, R.A., GHOSH, S.,  
A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria.  
Science 5;303(5663):1522-1526 (2004)
- ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L.,  
The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation.  
J Leukoc Biol 81(3):584-592 (2007)
- ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L.,  
Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation.  
Immunology Today 17:424 (1996)

**Hinweis auf Vorveröffentlichungen:**

**Publikationen:**

SCHERBERICH, J.E., KELLERMEYER, M.A., RIED, C., HARTINGER, A.,  
1-Alpha-Calciol modulates major human monocyte antigens and toll-like receptors TLR2  
and TLR4 in vitro.  
Eur J Med Res 10(4):179-182 (2005)

**Tagungsbeiträge:**

KELLERMEYER, M.A., RIED, C., HARTINGER, A., SCHERBERICH, J.E.,  
P10.07 Modulation of monocyte receptor antigens and toll-like receptor 2 and 4 by alphacal-  
ciol.  
Joint Scientific Meeting, Congress of Nephrology, Basel  
Kidney Blood Press Res, 27:370 (2004)

**Mündliche Vorträge:**

KELLERMEYER, M.A., SCHERBERICH, J.E., RIED, C., HARTINGER, A.,  
1-Alpha-Calciol modulates major human monocyte antigens and toll-like receptors TLR2  
and TLR4 in vitro.  
"Fellow's Night 2005", Nephrologisches Forum München (2005)



## 9 Danksagung

Ich bedanke mich bei Allen, die mich in den letzten Jahren auf vielfältige Weise unterstützt und damit die Entstehung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jürgen E. Scherberich, Klinikum München-Harlaching, für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Vielen Dank für die Durchsicht des Manuskriptes und die konstruktiven Anmerkungen.

Herrn Prof. Dr. med. vet. B. Kaspers danke ich für die Übernahme der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und die stets freundliche Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. A. Hartinger bedanke ich mich für den am Institut für Mikrobiologie und Hygiene zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Die Ausstattung wurde teilweise aus Mitteln der S.Sturm-Stiftung, München, an J.E. Scherberich, finanziert.

Herzlich bedanke ich mich bei Frau Christine Ried für die hervorragende Unterstützung vor Ort im Zell-Labor, die hilfreichen Ratschläge bei labortechnischen und analytischen Problemen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für die Ermöglichung elektronenmikroskopischer Untersuchungen und die fachliche Besprechung der Ergebnisse danke ich Herrn PD. Dr. Axel Walch, Inst. für Pathologie, Helmholtz Institut München-Neuherberg. Besonderer Dank gilt Frau Luise Jennen für ihre hilfreiche Unterstützung bei den Analysen.

Herrn Prof. Dr. S. Bhakdi danke ich für die Bereitstellung enzymatisch modifizierter Lipoproteine und die reibungslose Kooperation mit der Abt. für Mikrobiologie der Johann Gutenberg-Universität Mainz.

Recht herzlich gedankt sei allen Personen, die Blutproben für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die meine beiden Kinder in der letzten Zeit der Fertigstellung der Arbeit immer wieder liebevoll betreut haben.

Vielen Dank Dir, Joe, für die motivierende Unterstützung in jeder Lebenslage und bei den alltäglichen Kleinigkeiten, die für die Realisierung dieser Arbeit so wichtig war.